



Bases structurales de la régulation des cytokines par les héparanes sulfates : régulation génique et optimisation d'un inhibiteur de l'interféron-gamma.

Els Saesen

► To cite this version:

Els Saesen. Bases structurales de la régulation des cytokines par les héparanes sulfates : régulation génique et optimisation d'un inhibiteur de l'interféron-gamma.. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV004 . tel-00949161

HAL Id: tel-00949161

<https://theses.hal.science/tel-00949161>

Submitted on 19 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **BIOLOGIE STRUCTURALE ET NANOBIOLOGIE**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Els SAESEN

Thèse dirigée par **Hugues LORTAT-JACOB**

préparée au sein du groupe **Structure et Activité des Glycosaminoglycanes**

Institut de Biologie Structurale (IBS)

dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Bases Structurales de la régulation des cytokines par les héparanes sulfates : Caractérisation de l'interaction de l'IFN γ avec les héparanes sulfates

Thèse soutenue publiquement le **29 janvier 2013**,
devant le jury composé de :

Pr. Sylvie RICARD-BLUM

Pr., Institut l'université Lyon 1, Rapporteur

Pr. Fabrice ALLAIN

Pr., Université de Lille 1, Rapporteur

Pr. Christelle BRETON

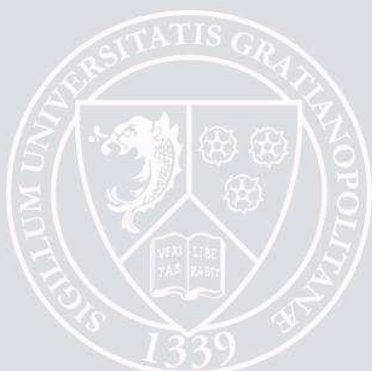
Pr., Université Joseph Fourier de Grenoble, Examineur

Dr. Régis DANIEL

DR, CNRS, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et
l'Environnement d'Evry Val d'Essonne, Examineur

Dr. Hugues LORTAT-JACOB

DR, CNRS, Institut de Biologie Structurale de Grenoble, Directeur de thèse,
Examineur



Voor Moeke,

De ware levenskunstenaar hoeft niet
van alles het beste te hebben
maar hij weet van alles het beste te maken.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le jury pour le temps qu'ils ont accordé à ce travail : Fabrice Allain, Sylvie Ricard-Blum, les rapporteurs, ainsi que Régis Daniel, Christelle Breton et Hugues Lortat-Jacob.

Hugues, merci d'avoir encadré ma thèse. Depuis mon master 2, tu as eu confiance en moi et tu m'as permis de mes études par une thèse ! Merci pour de ton soutien pendant ces dernières années ! Malgré ton agenda bien rempli, tu as pris le temps de suivre ma thèse et d'être disponible pour des conseils et des encouragements. Je te remercie également pour le temps passé à corriger, lire et relire mon manuscrit de thèse.

Cédric, Régis et Florence, merci de m'avoir initié à la spectrométrie de masse et merci pour le temps que vous avez pris pour organiser et effectuer les expériences du CE et du CE/MS. Je tiens tout particulièrement à remercier Cédric : merci pour tes explications détaillées sur le CE...et ce jusqu'à ce que je comprenne, ta disponibilité, tes retards pris à cause de mes expériences...mais surtout pour ta persévérance...1 nm peut faire la différence !

Anne, Aymeric et Emelie, merci de m'avoir aidé pour l'ITC. De nombreux passages étaient nécessaires pour obtenir des résultats satisfaisants. C'était toujours avec joie que je passais au CERMAV puisque vous étiez toujours là pour me donner un coup de main.

Delphine et Carlos, merci pour votre aide pour les essais de cristallisation de l'IFN γ . Vous avez pris le temps de me conseiller et de m'expliquer les différentes étapes !

Marc Nitz, thank you for the collaboration with the fluorescent assay! It was nice to have you some months in our laboratory. I hope we didn't make too much noise in the desk!

Je souhaite également remercier tous les membres du SAGAG :

Roro, merci pour les conseils scientifiques, le partage de ta vision critique sur mon travail et mon écriture pour lequel je t'en ai voulu et je t'en voudrais toujours et toutes les pauses café ! Et merde avec el manipo di sieclé ! Ton humeur, malgré l'absence du Mr. Fender était magnifico.

Rabia, merci pour ta gentillesse ! Tu étais toujours là pour les petits coups de blues mais également pour des petits repas ou des moments de pâtisserie –j'aurais un peu de temps libre, il faudra que l'on planifie un mercredi pâtisserie! Je te remercie également d'avoir pris le temps de corriger ma thèse !

Cédric, merci de m'avoir appris à purifier l'IFN γ , pour les expériences de RMN et tes conseils concernant les expériences biochimiques...Mais comme tu dis, est-ce que l'élève a dépassé le maître...On laissera la réponse en suspens!

Bridgette, les derniers 10 mois de thèse sans toi étaient durs. Comment survivre sans ta bonne humeur dans le bureau, tes petits conseils (on prend un café) et tellement d'autres choses !

C'était avec plaisir que j'ai passé la majorité de ma thèse à tes cotés ! Hakuna matata, it's a beautiful day ! Rendez-vous bientôt en Belgique ou au Pays-bas. Joepie, dan gaan we samen fritjes eten en een biertje drinken !

Sébastien, merci pour les moments IFN γ . Malgré le fait que je pars du SAGAG, je sais que l'IFN γ -team reste en forme !

Damien, merci de m'avoir donné un coup de main pour la purification des derniers mutants en quantité astronomique pour l'ITC ! J'espère que tu te remettras de cette dure épreuve !

Puis tous les autres SAGAG :

Matthieu, merci pour tes quiches Lorraines, ton humour -c'est vrai tu aurais pu devenir humoriste- et pour avoir piqué mes pipettes.

Adeline, même un bref passage a suffit ! Merci de m'avoir conseillé sur quel part de gâteau choisir (la plus grosse), d'avoir inventé le jeu des barbapapas pour Louane !

Mister Fender, merci pour ton humeur ! Dommage que tu sois parti aussi rapidement mais cela n'a pas empêché des repas délirants à H2 et des moments de ski de fond arrosé ! Par contre nous n'étions pas encore au loulou, une promesse t'attend.

Julia, merci pour les bons moments au sein du SAGAG ! J'espère que le retour dans ton Marseille natale t'as rendu plus heureuse qu'au milieu de ses montagnes tellement oppressantes pour toi !

Amal, tu étais tellement discrète sauf quand le grand amour parlait : voici sulfie !

Merci les filles « tupperware et séances de bronzage le midi »! Iza, Laure, Lucie et Violaine, heureusement que vous étiez là chaque midi pour parler de tous sauf de travail, qu'est-ce que c'était déstressant !

Merci aux garçons du Lim ! Désolé d'avoir envahit votre salle de réunion de nombreux midis avec nos conversations de nana et de m'être mal exprimé (tu peux me chauffer mon tupperware, c'est mieux ?). Je pense que je viendrai vous embêter encore quelques fois !

Puis toutes les autres personnes qui m'ont rendues la vie de tous les jours durant cette thèse un peu plus agréable par une petite conversation, un café, etc.: l'équipe du LEM : Monique, Pascal, Evelyne, Isabelle, Véro, Nicole, Philippe, Mélanie, Mickaël, Jean-Pierre ; Daphna, Elodie, Rime, Mylène (désolé pour le bruit), et tous ceux que j'ai oublié !

Puis mon informaticien favori, merci de m'avoir aidé tant de fois, l'informatique est dure quand on est Belge et blonde ! Linda, merci pour toute l'aide administrative et de t'être intéressée à l'avancement de ma thèse! Silvie, désolé pour la montagne de vaisselle que je t'ai fait pendant toutes ces purifications mais surtout merci d'avoir toujours gardé le sourire !

Puis de manières plus personnelles :

Merci à l'équipe œnologie, vous étiez/êtes toujours dispo pour déconner, pour un bon repas et une bonne petite bouteille de vin ! Didi, merci de m'avoir transféré un peu de la compétiteur-attitude ! Sebbie, merci de trouver un peu de temps dans ton agenda de ministre pour moi mais surtout n'oublie pas de me remercier quand tu gagneras le prix Nobel ! Caro, heureusement que tu es là, comme ça cela fait au moins deux nanas contre cette bande de mec ! Matt, je viens de réaliser tu es le seul qui est épargné d'un petit surnom ! Marseillais dans l'âme, merci pour ces weekends repos à Marseille ! Merci les amis d'avoir toujours été là !

Puis les autres amis, qui faute de place peuvent pas être précisés, vous n'étiez pas moins présents pour des moments agréables permettant de relâcher la pression de la thèse ! Bientôt, j'aurai à nouveau du temps !!!

En de Belgjes: sorry dat ik jullie heb achter gelaten! Maar elk bezoekje naar België geniet ik des te meer om jullie te kunnen zien of de sessies skype! Dankjewel om jezelf te zijn Liesbeth, woorden zijn te weinig maar je blijft mijn beste vriendinneke! Kurt, mijn zondagsavond vriendje en meer. Katha, hoeveel jaren kennen we elkaar al, ook al zien we elkaar weinig, van elk momentje samen genieten we. Nadine, Luc en Marieke, jullie zijn er voor me elk bezoekje in België! En dan alle andere mensjes die ik op elk bezoekje terug vind!

Enfin, Alfie, merci d'avoir adopté la petite Belge. Bon j'avoue, je ne t'ai pas laissé le choix, mais à chaque fois j'adore les repas, la trancha, les blagues, les discussions cuisine,...Clairsou, tu es vraiment une deuxième maman! Merci d'être venu chaque fois que j'avais besoin de toi, merci pour tes appels quotidiens, ... les mots sont trop limités pour exprimer tous ce que tu fais pour moi! Alex et soeurrette, vous êtes vraiment géniaux merci pour tous les moments délirants et les moments de joie de vivre ensemble!

Lieve & Sophie, ook al zijn jullie wat ver weg. Ik weet dat ik op jullie kan rekenen! Het is super fijn jullie regelmatig te zien ook al wonen we wat ver weg!

Vake, dankjewel voor de kans dat je me gegeven hebt om te studeren maar meer nog om mijn eigen wegje op te gaan, om me te kans te geven in Frankrijk verder te studeren en me in eender welke omstandigheden me te blijven aanmoedigen! Wie had dat ooit gedacht, Els dokter! Ik weet het, moeke is fier op me!

Nico, tu es le meilleur, sans toi je n'aurai jamais réussi. Merci pour l'amour, la patience et les encouragements au quotidien ! Je pense qu'au bout de cette thèse, tu sais presque autant sur les héparanes sulfates et l'interféron gamma que moi ! Merci d'avoir corrigé, recorrecté et rerecorrecté ma thèse de toutes mes erreurs de Français.

Doudou, Louane, dankjewel om elke avond en elk weekend mijn hoofd ver weg van mijn doctoraat te brengen met al je lachjes, deugenietestrecken, ...

SOMMAIRE

SOMMAIRE	I
REMERCIEMENTS	I
INDEX DES FIGURES	IX
INDEX DES TABLEAUX	XII
ABREVIATIONS	XIII
INTRODUCTION	I
I. Interféron gamma	1
I.1. Histoire de la découverte de l'interféron gamma	1
I.1.a. La découverte des interférons	1
I.1.b. La nomenclature de l'interféron gamma	2
I.1.c. Les différentes sortes d'interférons	3
I.1.d. L'évolution de l'interféron gamma	5
I.2. L'expression de l'interféron gamma	7
I.2.a. Les cellules exprimant l'interféron gamma	7
I.2.b. Les signaux déclenchant l'expression de l'IFN γ	8
I.2.c. Les modulateurs de l'expression de l'IFN γ	10
I.3. Du gène à la protéine	13
I.3.a. Le gène codant pour l'IFN γ	13
I.3.b. La voie de synthèse	13
I.3.c. La séquence primaire de l'IFN γ	13
I.3.d. La structure de l'IFN γ	14
I.4. Le récepteur	15
I.4.a. La structure du récepteur	15
I.4.b. L'interaction du récepteur avec l'IFN γ	16
I.4.c. L'expression du récepteur	17
I.4.d. Pré-assemblage du récepteur à la surface cellulaire	18
I.5. Signalisation	18
I.5.a. La voie de signalisation JAK-STAT	18
I.5.b. Les cascades de signalisation alternatives	20
I.5.c. Le contrôle sur la durée de la signalisation	21
I.5.d. La localisation nucléaire de l'IFN γ	22
I.6. Le domaine C-terminal de l'interféron gamma	23
I.7. Rôles biologiques de l'IFN γ	24
I.7.a. Les rôles observés in vitro	24
I.7.b. Répercussions de l'IFN γ in vivo	28
I.8. Utilisation thérapeutique d'IFN γ ou d'anticorps monoclonaux contre l'IFN γ	31
I.8.a. Injection de l'IFN γ	31
I.8.b. Inhibition de l'IFN γ	32
II. Les héparanes sulfates	35
II.1. Les protéoglycanes	35
II.2. Les corps protéiques	35
II.2.a. Les protéoglycanes membranaires	36
II.2.b. Les protéoglycanes matriciels	39
II.2.c. Les protéoglycanes intracellulaires	41
II.2.d. Les protéoglycanes circulants	42
II.3. La structure des différents GAG	42
II.3.a. Acide hyaluronique	44
II.3.b. Chondroïtine sulfate	44
II.3.c. Dermatan sulfate	44
II.3.d. Kératane sulfate	45
II.3.e. Héparane sulfate & héparine	45

II.4.	La biosynthèse des HS	46
II.4.a.	La production du tétrasaccharide « linker » et son positionnement.....	48
II.4.b.	Le choix de l'élongation Hp/HS ou CS/DS.....	48
II.4.c.	La polymérisation.....	49
II.4.d.	Les modifications du polymère	49
II.4.e.	Le concept « Gagosome »	52
II.5.	La structure des héparanes sulfates	53
II.6.	Le trafic des PG.....	54
II.7.	La catalyse et le remodelage des HS.....	54
II.7.a.	L'endocytose	55
II.7.b.	Le shedding	56
II.7.c.	Les sulfatases.....	56
II.7.d.	Les héparanases	57
III.	L'interaction des protéines avec les héparanes sulfates	59
III.1.	Fonctions d'interaction de protéines avec des GAG	60
III.1.a.	Les HS provoquent un changement conformationnel.....	61
III.1.b.	Les HS favorisent les contacts protéines-protéines	62
III.1.c.	Les HS stabilisent des gradients de chimiokines	63
III.1.d.	Les HS en tant que co-récepteur.....	64
III.1.e.	Les HS sont impliqués dans l'adhésion cellulaire	65
III.1.f.	Les HS protègent et activent les protéines.....	66
III.1.g.	Les HS stockent et relâchent des protéines.....	66
III.1.h.	Les HS sont également exploités par des pathogènes.....	67
III.2.	Méthodes de caractérisation de l'interaction.....	68
III.2.a.	Les méthodes biochimiques	69
III.2.b.	Les techniques ex vivo (sur cellules en culture).....	70
III.2.c.	Les approches biophysiques	70
III.2.d.	L'élucidation de la structure du complexe.....	71
III.3.	Différents degrés de spécificité d'interaction.....	73
III.3.a.	Antithrombine III : liant une séquence d'HS strict.....	73
III.3.b.	FGF : l'importance de certains groupements sulfates	74
III.3.c.	L'utilisation de multiples domaines NS	76
III.3.d.	Les protéines lient des séquences a priori aléatoires	77
III.4.	Quelle ampleur de spécificité d'interaction entre protéine et HS ?	77
III.5.	L'interaction de l'IFN γ avec les HS.....	78
III.5.a.	Identification des HS comme ligand de l'IFN γ	78
III.5.b.	Rôle physiologique de l'interaction IFN γ :HS	81
	OBJECTIFS DU PROJET	83
	MATERIEL ET METHODES.....	87
I.	Expression et purification de l'IFNγ WT et mutants.....	87
I.1.	Expression de l'IFN γ	87
I.1.a.	Transformation des bactéries E. coli avec le plasmide de l'IFN γ	87
I.1.b.	Expression de l'IFN γ par des bactéries E. coli	87
I.2.	Purification de l'IFN γ	88
I.2.a.	Purification de l'IFN γ WT et mutants ponctuels	88
I.2.b.	Clonage et expression de la protéine de fusion IFN γ SD1-MBP.....	89
I.2.c.	Purification de l'IFN γ SD1, SD2, Δ 136 et Δ 124.....	92
I.3.	Electrophorèse des protéines	93
II.	Caractérisation du site d'interaction de l'IFNγ pour les HS/Hp et pour l'IFNγR.....	95
II.1.	Test d'interaction de l'IFN γ avec des oligosaccharides issus d' Hp par RMN	95
II.2.	Test d'interaction par SPR (Biacore®)	95
II.2.a.	Principe du fonctionnement du Biacore	95
II.2.b.	Biotinylation du récepteur	97
II.2.c.	Fonctionnalisation des surfaces	97
II.2.d.	Test d'interaction avec le récepteur et l'Hp.....	98
II.3.	Calorimétrie de titration isotherme.....	98
II.3.a.	Principe de fonctionnement de la titration calorimétrie isothermale.....	98

II.3.b.	Mesure de la thermodynamique de l'interaction IFN γ :Hp	99
II.4.	Mesure de l'activité biologique de l'IFN γ	100
II.4.a.	Mesure de l'activité antivirale de l'IFN γ	100
II.4.b.	Mesure de l'activité antivirale de l'IFN γ sur les cellules dépourvues d'HS.....	101
III.	Recherche du site d'interaction des HS pour l'IFNγ	103
III.1.	Préparation d'une banque d'oligosaccharides	103
III.1.a.	Digestion d'HS avec de l'héparinase III.....	103
III.1.b.	Séparation par taille par filtration sur gel sur Biogel P10.....	103
III.1.c.	Préparation d'une banque d'octasaccharides	103
III.2.	Analyse de la banque de dp8 par MALDI-TOF-MS	104
III.2.a.	Principe de la technique de la MALDI-TOF-MS	104
III.3.	Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les dp8 par « filter binding assay »	106
III.3.a.	Principe du « filter binding assay »	106
III.3.b.	Marquage des octasaccharides au tritium	108
III.3.c.	Détermination de la concentration des fractions de dp8 marquées au tritium	108
III.3.d.	Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les fractions de dp8 par FBA	108
III.4.	Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les dp8 par capteur fluorescent	109
III.4.a.	Principe de fonctionnement du capteur fluorescent.....	109
III.4.b.	Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les fractions de dp8 par l'utilisation d'un capteur fluorescent	110
III.5.	Fractionnement de dp8 par une colonne d'affinité d'IFN γ	111
III.5.a.	Principe de la colonne d'affinité de l'IFN γ	111
III.5.b.	Préparation de la colonne d'affinité peptide	111
III.5.c.	Elution des différentes fractions de dp8 par la colonne d'affinité de l'IFN γ	112
III.6.	Analyse de l'affinité des différentes fractions de dp8 pour l'IFN γ par CE et CE-MS	112
III.6.a.	Principe de l'électrophorèse capillaire.....	112
III.6.b.	Préparation et greffage du capillaire.....	116
III.6.c.	Analyse par électrophorèse capillaire en détection UV	117
III.6.d.	Analyse par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse.....	117
IV.	Cristallisation	119
IV.1.	Principe de la résolution d'une structure par cristallographie aux rayons X	119
IV.1.a.	Pourquoi faut-il un cristal pour résoudre la structure par rayons X?	119
IV.1.b.	La cristallogénèse	120
IV.1.c.	Simulation du désordre par le logiciel IUPred de l'IFN γ	121
IV.1.d.	La cristallogénèse d'un complexe	122
IV.1.e.	La récupération des cristaux et leur congélation	122
IV.1.f.	Du cliché de diffraction à la résolution de la structure	123
IV.2.	Préparation du complexe	124
IV.2.a.	Préparation de l'IFN γ et des oligosaccharides employés	124
IV.2.b.	Pré-incubation du complexe	124
IV.3.	Criblage des conditions menant à la cristallisation du complexe	124
IV.3.a.	Tests initiaux de cristallisation	124
IV.3.b.	Optimisation des conditions de cristallisation	125
IV.4.	Diffraction des cristaux	125
RESULTATS	127	
I.	Rôle du domaine C-terminal de l'IFNγ dans l'interaction avec les HS et le IFNγR	127
I.1.	Purification de l'interferon gamma WT	128
I.1.a.	Le choix du système d'expression.....	128
I.1.b.	Purification de l'IFN γ WT.....	129
I.2.	Identification des résidus impliqués dans l'interaction par RMN	131
I.3.	Purification des mutants de l'IFN γ	133
I.3.a.	Purification des mutants ponctuels	133
I.3.b.	Mise au point de la purification des mutants IFN γ SD1, IFN γ SD2, IFN γ Δ 136 et IFN γ Δ 124.....	134
I.3.c.	Résumé des purifications.....	143
I.4.	Test d'interaction de l'IFN γ avec son récepteur et avec les HS par SPR.....	144
I.4.a.	Analyse de l'interaction de l'IFN γ avec les HS.....	144
I.4.b.	Analyse de l'interaction de l'IFN γ avec l'IFN γ R.....	151
I.5.	Aspects thermodynamiques de l'interaction de l'IFN γ avec les HS	158

I.5.a.	Détermination de la stœchiométrie de l'interaction.....	158
I.5.b.	Contribution du domaine C-terminal de l'IFN γ pour l'interaction avec les HS	162
I.5.c.	Importance de la taille de l'oligosaccharide dans l'interaction avec l'IFN γ	166
I.6.	Activité biologique de l'IFN γ	167
I.6.a.	Principe du test d'activité	168
I.6.b.	Importance du domaine C-terminal de l'IFN γ pour son activité biologique	169
I.6.c.	Influence des HS dans l'activité biologique de l'IFN γ	170
I.7.	Conclusion	172
II.	Recherche du site d'interaction de l'IFNγ pour les HS	177
II.1.	Préparation d'une banque d'oligosaccharides	178
II.1.a.	Préparation d'une banque d'oligosaccharides de taille différente	179
II.1.b.	Préparation d'une banque d'octasaccharides	181
II.2.	Analyse de la banque de dp8 préparée par MALDI-TOF-MS.	182
II.2.a.	Analyse du mélange des dp8 par MALDI-TOF-MS	183
II.2.b.	Analyse des différentes fractions de dp8 par MALDI-TOF-MS	184
II.3.	Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les dp8 par « filter binding assay »	191
II.3.a.	Marquage en tritium d'octasaccharides	192
II.3.b.	Méthode de la détermination des K_D par la linéarisation de Scatchard	193
II.3.c.	Mesure d'affinité entre l'IFN γ et les dp8 par « filter binding assay »	194
II.4.	Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les dp8 à l'aide d'un capteur fluorescent	196
II.5.	Elution des fractions de dp8 par une colonne d'affinité	199
II.5.a.	Elution de la banque de dp8 par la colonne d'affinité de l'IFN γ	200
II.6.	Analyse des complexes IFN γ :dp8 par électrophorèse capillaire	202
II.6.a.	Calcul de la mobilité électrophorétique	202
II.6.b.	Couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse	206
II.7.	Conclusion	214
III.	Cristallisation du complexe IFNγ:oligosaccharide de type Hp	217
III.1.	Difficultés de la cristallisation d'un complexe protéine - HS.....	218
III.1.a.	Difficultés côté de l'IFN γ	218
III.1.b.	Difficultés côté des HS.....	219
III.1.c.	Structures des complexes protéine-GAG connues aujourd'hui	220
III.2.	La cristallogenèse du complexe IFN γ :oligosaccharides de type Hp	220
III.2.a.	La formation du complexe.....	220
III.2.b.	Le criblage des conditions de cristallisation	222
III.2.c.	L'optimisation de la cristallogenèse	222
III.3.	La diffraction des cristaux du complexe IFN γ :oligosaccharides de type Hp	223
III.4.	Conclusion	225
	DISCUSSION GENERALE	227
	REFERENCES	235
	ANNEXE	259

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la signalisation des différents interférons.....	5
Figure 2 : Schéma représentant l'origine de l'IFN γ	7
Figure 3 : Contrôle épigénétique de l'expression de l'IFN γ dans les cellules CD4 $^{+}$	12
Figure 4 : Analyse par western blot d'IFN γ produit par des leukocytes.	14
Figure 5 : Structure de l'IFN γ	15
Figure 6 : Structures des polypeptides récepteurs de l'IFN γ	16
Figure 7 : Structure moléculaire de l'IFN γ complexé avec l'IFN γ R α	17
Figure 8 : Changement du conformation de l'IFN γ R lors de son interaction avec l'IFN γ	18
Figure 9 : Schéma de la cascade la signalisation de l'IFN γ par « JAK-STAT ».	20
Figure 10 : Les cascades de signalisation alternative de l'IFN γ	21
Figure 11 : Schéma du domaine C-terminal de l'IFN γ	23
Figure 12 : Alignement des séquences C-terminales de l'IFN γ	24
Figure 13 : Schéma représentant les actions pro- et anti-inflammatoires de l'IFN γ	30
Figure 14 : Le glycocalyx.....	35
Figure 15 : Les protéoglycanes transmembranaires.	36
Figure 16 : Alignement de séquence des différents glypicanes.	38
Figure 17 : Présentation de la structure des glypicanes.	38
Figure 18 : Structure de la serglycine avec des chaînes de GAG.	41
Figure 19 : La structure disaccharidique de base et les modifications possibles des GAG.	43
Figure 20 : Modèle de l'organisation des HS en domaines et comparaison avec l'Hp.	46
Figure 21 : Schéma de la biosynthèse des HS.....	47
Figure 22 : Modification et diversité des HS.	50
Figure 23 : Schéma du "Gagosome".	52
Figure 24 : Structure de l'acide iduronique.	54
Figure 25 : Mécanismes de remodelage des HS présents sur la surface cellulaire.	55
Figure 26 : Site de coupure par les héparinases I, II et III.	58
Figure 27 : Processus biologiques dans lesquels les protéines liant les HS sont impliquées... 60	60
Figure 28 : Présentation des diverses fonctions dans lesquelles les HS sont impliqués.	61
Figure 29 : Mécanisme de régulation de l'activité enzymatique de l'ATIII.	62
Figure 30 : Structure du tétramère de RANTES en interaction avec l'Hp.	63
Figure 31 : Illustration des sites d'interaction des HS sur les chimiokines.	64
Figure 32 : Comparaison des structures du complexe FGF:FGFR:HS.	65
Figure 33 : Modèle d'interaction entre SDF-1 et un dodécasaccharides d'HS.....	66
Figure 34 : Les pathogènes exploitent les HS sur la surface cellulaire de leur hôte.	68
Figure 35 : Structure du site d'interaction entre l'ATIII et le pentasaccharide.	74
Figure 36 : Importance des groupements 6-O-sulfate dans l'interaction des HS avec FGF-1 et FGF-2.	75
Figure 37 : Modèle du site d'interaction de l'HS pour IFN γ	80
Figure 38 : Structure du mime du site d'interaction des HS pour l'IFN γ	80
Figure 39 : L'Hp régule la protéolyse et la distribution tissulaire de l'IFN γ	82
Figure 40 : Principe du fonctionnement de la résonance plasmonique de surface.	96
Figure 41 : Principe de fonctionnement de la calorimétrie de titration isotherme.	99
Figure 42 : Principe de la technique MALDI-TOF.....	105
Figure 43 : Schéma du principe du « filter binding assay ».	107
Figure 44 : Principe du capteur fluorescent.	110
Figure 45 : Principe de la migration des molécules dans l'électrophorèse capillaire.....	113

Figure 46 : Forces appliquées aux cations, anions et molécules neutres dans la CE.	114
Figure 47 : schéma d'une source par électroébulisaison (en mode positif).	115
Figure 48 : Représentation des différentes étapes pour l'obtention de la structure d'une protéine par cristallographie aux rayons X.	119
Figure 49 : Diagramme de phase d'une protéine.	120
Figure 50 : Système de cristallisation par diffusion de vapeur avec goutte assise.....	121
Figure 51 : Carte du vecteur pET11a.	129
Figure 52 : Suivi de l'expression et des lavages des CI (SDS-PAGE).	130
Figure 53 : SDS-PAGE et Chromatogrammes de la purification de l'IFN γ	131
Figure 54 : Histogramme de la variation des déplacements chimiques de l'IFN γ lors de la titration avec différents oligosaccharides.	132
Figure 55 : Liste des mutants ponctuels produits.	133
Figure 56 : Présentation des mutants multiples et des mutants issus de la délétion du domaine C-terminal de l'IFN γ	134
Figure 57 : Clonage de l'IFN γ SD1 dans le vecteur pDB.His.MBP.	138
Figure 58 : Vérification de la présence de l'insert IFN γ SD1 dans le vecteur pDP.His.MBP.	139
Figure 59 : Test d'expression de la protéine de fusion.	139
Figure 60 : Purification de l'IFN γ SD1-MBP et coupure d'une étiquette MBP.	140
Figure 61 : Influence des adjuvants sur le repliement de l'IFN γ SD1.	142
Figure 62 : Purification et validation de la pureté de l'IFN γ SD2.	143
Figure 63 : Schéma de la méthode de l'immobilisation de l'Hp sur la sensor chip puis interaction avec l'IFN γ	145
Figure 64 : Sensorgrammes de l'interaction de l'IFN γ avec de l'Hp immobilisée.	147
Figure 65 : Analyse de l'interaction IFN γ :Hp <i>via</i> la linéarisation de Scatchard.	148
Figure 66 : Histogramme de l'affinité entre l'IFN γ et mutant avec l'Hp immobilisée.	150
Figure 67 : Biotinylation de l'IFN γ R α et fixation sur la sensor chip.	151
Figure 68 : Sensorgrammes de l'interaction de l'IFN γ avec de l'IFN γ R immobilisé.	154
Figure 69 : Analyse de l'interaction IFN γ :IFN γ R <i>via</i> la linéarisation de Scatchard.	155
Figure 70 : Histogramme de l'affinité entre l'IFN γ et mutant avec l'IFN γ R immobilisé par Scatchard.	156
Figure 71 : Histogramme de l'affinité entre l'IFN γ et mutant avec l'IFN γ R immobilisé <i>via</i> la cinétique.	156
Figure 72 : Courbes de microcalorimétrie de l'IFN γ WT avec les dp8.	160
Figure 73 : Courbes de microcalorimétrie en sens « inverse » de l'IFN γ WT avec les dp8.	161
Figure 74 : Schéma des deux modèles d'interaction entre l'IFN γ et les dp8.	162
Figure 75 : Courbes de microcalorimétrie de l'IFN γ Δ 136 avec les dp8.	164
Figure 76 : Histogramme des paramètres thermodynamiques de l'interaction de l'IFN γ WT et l'IFN γ Δ 136 avec les dp8 issus d'Hp.	165
Figure 77 : Importance du domaine C-terminal de l'IFN γ pour l'interaction avec les dp8. ...	166
Figure 78 : Taille minimale d'oligosaccharide interagissant avec l'IFN γ à haute affinité.	167
Figure 79 : Schéma du principe du test d'activité antivirale.	168
Figure 80 : Activité antivirale des mutants par rapport à celle de l'IFN γ WT.	169
Figure 81 : Analyse de l'expression des HS sur la surface cellulaire après traitement par les Hep I et III.	171
Figure 82 : Baisse du signal d'absorbance lors de l'essai antiviral incubant les cellules uniquement 4 h avec de l'IFN γ WT.	172
Figure 83 : Modèle hypothétique d'action de l'IFN γ	176
Figure 84 : Substrat de l'héparinase III.	179
Figure 85 : Séparation des oligosaccharides par leur taille avec une filtration sur gel.	180

Figure 86 : Séparation des dp8 en fonction de leur charge sur une colonne échangeuse d'anions Propac PA1.	181
Figure 87 : Spectre MALDI-TOF-MS du mélange des dp8.	184
Figure 88 : Spectre MALDI-TOF-MS des différentes fractions de dp8.	190
Figure 89 : Principe du marquage des dp8 au tritium.	192
Figure 90 : Courbe d'étalonnage avec la fraction de dp8 non marquée.	192
Figure 91 : Calcul de l'affinité par l'analyse Scatchard.	193
Figure 92 : Détermination de l'affinité par Scatchard des fractions de dp8.	195
Figure 93 : Histogramme des affinités de l'IFN γ pour les différentes fractions de dp8 mesurée par FBA.	195
Figure 94 : Titration des fractions de dp8 avec le peptide-fluorescent.	198
Figure 95 : Histogramme des affinités entre le peptide C-terminal de l'IFN γ et les fractions de dp8.	199
Figure 96 : Profil d'élution des fractions de dp8 par colonne d'affinité.	201
Figure 97 : Electrophorégramme de l'IFN γ	203
Figure 98 : Electrophorégrammes de mélanges préincubés de l'IFN γ avec les fractions de dp8.	205
Figure 99 : Histogramme des mobilités électrophorétiques de l'IFN γ et du mélange de l'IFN γ avec les fractions de dp8.	206
Figure 100 : Spectre de masse de l'IFN γ analysé par CE-MS.	207
Figure 101 : Spectre de masse de l'IFN γ préincubé avec la fraction 8.23 analysé par CE-MS.	208
Figure 102 : Spectres de masse de l'IFN γ préincubé avec différents dp8 analysés par CE-MS.	212
Figure 103 : Spectres de masse de l'IFN γ préincubé avec le dp8 non fractionnés analysés par CE-MS.	213
Figure 104 : Structure du mime du site d'interaction des HS pour l'IFN γ en interaction avec ce dernier.	217
Figure 105 : Prédiction du désordre dans la structure de l'IFN γ	219
Figure 106 : Structure des oligosaccharides de synthèse employés pour la cristallographie.	221
Figure 107 : Cristaux du complexe IFN γ -oligosaccharide.	222
Figure 108 : Clichés de diffraction du cristal diffractant avec une résolution maximale de 7,64 Å.	223
Figure 109 : Calcul du nombre de dimères plausibles par maille.	224

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des interférons trouvés chez l'homme.....	4
Tableau 2 : Liste des facteurs de transcription interagissant avec le gène de l'IFN γ	11
Tableau 3: Distribution des différents GAG dans les différents tissus.	43
Tableau 4: Conditions d'analyse du CE et CE/MS.....	118
Tableau 5 : Résumé de la purification de l'IFN γ WT et les différents mutants.	144
Tableau 6 : Tableau récapitulatif de l'étude de l'interaction de l'IFN γ avec l'Hp par SPR.....	150
Tableau 7 : Tableau récapitulatif de l'interaction de l'IFN γ avec l'IFN γ R par SPR.	157
Tableau 8 : Données thermodynamiques de la titration IFN γ :dp8 par ITC « classique » et « inverse ».	165
Tableau 9 : Tableau récapitulatif de la quantité des différents dp8 obtenus.	182
Tableau 10 : Composition des dp8 de chaque fraction.	191
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des masses moléculaires obtenues par CE-MS.	214

ABREVIATIONS

2-5A	2'-5' oligoadenylate
3-UTR	3-untranslated region
ΔG	Différence d'énergie libre de Gibbs
ΔH	Différence d'enthalpie
ΔT	Différence d'entropie
<u>A</u>	
AA	acides amine
AcM	anticorps monoclonale
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
ARE	adenylate uridylylate-riche elements
ARNss	acide ribonucléique à un brin
ARNds	acide ribonucléique à double brin
ARNm	acide ribonucléique messenger
Asn	asparagine
AT	anti-thrombine
<u>B</u>	
BH4	borohydrure de sodium
BSA	bovine serum albumin
<u>C</u>	
c	facteur de Wiseman
C5Epi	C5-épimérase
CE	électrophorèse capillaire
CD4+	lymphocytes T auxiliaires
CD8+	lymphocytes T cytotoxiques
CI	corps d'inclusion
CS	chondroïtines sulfates
<u>D</u>	
Da	dalton
DAG	1,2-diacylglycerol
DEAE	diéthylaminoéthyl
DM	dimère
DNA	deoxyribonucleic acid
DNAc	acide désoxyribonucléique complémentaire
dp	degré de polymérisation
DS	dermatan sulfates
dsDNA	dsRNA specific adenosine deaminase
<u>E</u>	
EDC	ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESI	électrospray ionisation
EXT 1/2	exostose 1/2
<u>F</u>	
FBA	filter binding assay
FDA	agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
FGFR	récepteur du facteur de croissance des fibroblastes
FRET	transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
FXa	facteur Xa
<u>G</u>	
GalNAc	acide glucuronique N-acétylé
GalT I/II	galactosyltransférase I/II
GAG	glycosaminoglycane

GAS	gamma activated séquences
GlcA	acide glucuronique
GlcATI	glucuronosyltransférase I
Gly	glycine
GPC	glypicane
GPI	glycosylphosphatidylinositol
H	
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène anion superoxide
HA	acide hyaluronique
HABA	2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid
Hep	héparinase
HexA	acide hexuronique
HGF	hepatocyte growth factor
Hp	héparine
HPC	hydroxypropylcellulose
HuZAF	Fontolizumab
HS	héparanes sulfates
HSPG	héparanes sulfate protéoglycane
HSepi	C5-épipimérisation d'héparane sulfate
I	
ICAM	molécule d'adhésion intercellulaire
IC50	<u>concentration inhibitrice médiane</u>
IdoA	acide iduronique
IFN	interferon
IFN γ	interferon gamma
IFN γ R	récepteur à l'interferon gamma
Ig	immunoglobuline
IKK	I κ B kinase
IL	interleukine
ILM-	matrices liquides ioniques
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
IP3	1,4,5-inositoltriphosphate
IP-10	interferon gamma-induced protein 10
IPTG	sopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRF9	interferon regulatory factor 9
IRF	interferon gamma regulatory factor
ISG	interferon stimulated gene
ISRE	interferon stimulated response element
ITC	titration calorimétrique isothermale
J	
JAK1	janus kinase 1
JNK	jun N-terminal kinase
K	
K _a	constante d'association
K _d	constante de dissociation
KS	kératanes sulfates
L	
LB	lysogeny broth
LDL	low density lipoproteins
LPS	lipopolysaccharides
M	
MALDI	désorption-ionisation laser assistée par matrice
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	maltose binding protein
MCS	mutiple cloning site
MDCK	cellules épithéliale du Madin-Darby canine kidney
MEC	matrice extracellulaire
MHC	complexe majeur d'histocompatibilité
Mig	immunoglobuline membranaire

MIP- α	macrophage inflammatory protein α
MM	monomère
MME	monomethyl ether
MS	spectrométrie de masse
MM	masse moléculaire
MWCO	molecular weight cut off
<u>N</u>	
n	stœchiométrie
NA	N-acétylé
NDST	N-déacétylase-N-sulfotransférase
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NG2	neuron-glia antigen 2
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NK	natural killer cell
NKT	natural killer T cell
NLS	signal de localisation nucléaire
NO	acide nitrique
NS	N-sulfaté
<u>O</u>	
O ₂ -	anion superoxide
OST	sulfotransférase
<u>P</u>	
PAPS	adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate
PBS	phosphate buffered saline
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule
PEG	polyéthylène glycole
PF-4	platelet factor 4
PG	protéoglycanes
pH	potentiel d'Hydrogène
pI	point isoélectrique
PI3-K	phosphoinositide 3 kinase
PKC	protéine kinase C
PKR	double-stranded RNA activated protein kinase
PSB	Partnership for Structural Biologie
<u>R</u>	
R	la constante universelle des gaz parfaits
R	Récepteur
RANTES	regulated and normal T cell expressed and secreted
Rap1	ras-related protein 1
RE	réticulum endoplasmique
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	dérivés réactifs d'oxygène
Rpm	roats per minute
<u>S</u>	
SDF	stromal cell-derived factor-1
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	serine
SOCS	suppressor of cytokine signalling
SPR	résonance plasmonique de surface
ssRNA	RNA à brin simple
STAT	signal transduction and activation of transcription
SVF	sérum de veau foetal
<u>T</u>	
T	température (en Kelvin)
T CD8+	cellules T cytotoxique
TCR	récepteur aux cellules T
TEV	tobacco etch virus
TGF β	transforming growth factor β
TGF	transforming growth factor
TLR	toll like receptor

TNF α	facteur de nécrose tumorale α
TMG	1,1,3,3-tetramethylguanidine
TOF	temps de vol
TLR	toll like receptor
TYK2	tyrosine kinase 2
<u>U</u>	
Uma	unité de masse atomique
UV	ultraviolet
<u>V</u>	
VCAM	molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VSV	vesicular stomatitis virus
<u>W</u>	
WT	wild type
<u>X</u>	
XT	xylosyltransférase
XTT	Tétrazolium-3,3'-[1-[(phénylamino) carbonyl]-3,4-tétrazolium] bis (4-méthoxy-6-nitro)]benzène sulfonique hydraté

INTRODUCTION

I. Interféron gamma

I.1. Histoire de la découverte de l'interféron gamma

I.1.a. La découverte des interférons

L'histoire des interférons commence en 1957 quand Alick Isaacs *et al.* [1] observèrent une inhibition de la réplication virale dans des cellules infectées [1]. En effet ils cherchaient à comprendre le phénomène d'interférence, connue depuis 1935, où l'infection virale d'une cellule peut interférer avec une autre infection. Alick Isaacs *et al.* [1] ont alors découvert qu'une substance, sécrétée par les cellules lors du contact avec un virus, protège d'autres cellules de l'infection. La première cytokine est alors découverte et ils l'appelleront « interferon » (IFN). Depuis ce moment, un grand intérêt pour « l'interféron » a vu le jour. L'interféron représentait en effet pour les scientifiques de cette époque une molécule antivirale prometteuse grâce au fait qu'elle était endogène, non-toxique et active contre une large gamme de virus.

Huit années plus tard, en 1965, Wheetlock *et al.* [2] découvraient une autre macromolécule soluble, avec une activité antivirale, sécrétée dans le milieu de culture des leucocytes humains après incubation avec la phytohemagglutinine (lectine de plante) [2]. Cette molécule, appelée à l'époque « interferon-like » se distinguait d'autres préparations d'interféron car elle était sensible à la chaleur et au pH acide.

Deux études ont confirmé l'existence de cet « interferon-like » comme une molécule à part entière. La première a été menée par Falcoff *et al.* [3] qui ont caractérisé cet interféron par filtration sur gel et par colonne échangeuse d'ions (diéthylaminoéthylcellulose-DEAE). Ils en ont estimé la masse moléculaire, autour de 50 kDa, ce qui est supérieur à celle de l'interféron classique caractérisé par une masse moléculaire autour de 25kDa [3]. La seconde a été menée par Youngner et Salvin [4] qui ont démontré que cet « interferon-like » avait toutes les propriétés antivirales de l'interféron mais qu'il possédait en plus une sensibilité à la chaleur et au pH acide ce qu'il n'était pas le cas de l'interféron. Ils en ont déduits qu'il s'agit d'une molécule distincte. De plus, cet « interferon-like » n'était pas neutralisé par l'ajout d'un antisérum dirigé contre l'interféron [4].

Grâce à ces deux études majeures, l'existence de cet « interféron-like » n'était plus remise en question. Par contre, différentes nomenclatures étaient employées : « *interféron type II* » - afin de distinguer les deux sortes d'interférons observés - et « *immune interféron* » - en référence aux cellules produisant cet interféron -. Ce n'est qu'en 1980, après la purification des interférons de type I (alpha et bêta), qu'un comité d'expert a proposé la nomenclature « *interféron gamma* » (IFN γ) pour cet « interféron-like » [5] et avant sa purification. En dépit de ces recommandations le terme interféron de type II est encore largement utilisé.

La purification de l'IFN γ est réalisée avec succès entre 1982 et 1989 par différents laboratoires et ce avec des systèmes cellulaires différents [6-8]. Puis, le clonage de l'ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) de l'IFN γ a également été réalisé peu de temps après [9-10]. La progression des connaissances sur l'IFN γ n'a cessé d'évoluer avec l'arrivée des nouveaux outils de biologie moléculaire et de nouveaux protocoles de purification.

I.1.b. *La nomenclature de l'interféron gamma*

L'IFN γ (ou IFN de type II) a été découvert en tant que molécule antivirale, ressemblant aux IFN de type I uniquement du fait qu'à l'époque de sa découverte les tests antiviraux étaient bien maîtrisés et sensibles. Par contre, l'effet antiviral de l'IFN γ est maintenant considéré comme marginal par rapport à celui de l'IFN de type I. L'IFN γ est plus reconnu pour son rôle dans la régulation du système immunitaire. D'autre part, la structure de l'IFN γ ne ressemble que superficiellement à celle des IFN de type I et III et le récepteur employé n'est pas le même. Enfin, l'IFN de type I est sécrété par de nombreuses cellules contrairement à l'IFN γ qui est majoritairement exprimé par les cellules tueuses (natural killer ou NK et natural killer T cells ou NKT), les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) et les lymphocytes T auxiliaires de type 1 (CD4+ Th1).

Pour toutes ces raisons certains scientifiques déclarent que si l'IFN γ devait être reclassé aujourd'hui, il appartiendrait aux interleukines (IL) [11]. Les interleukines sont en effet un sous-groupe des cytokines, majoritairement sécrétées par des cellules du système immunitaire et elles ont un rôle essentiel dans celui-ci. Ces interleukines sont associées aux maladies auto-immunes et immunodéficientes. Toutes ces caractéristiques correspondent effectivement à celles de l'IFN γ .

L'IFN γ est parfois référencé en tant que lymphokine [12]. Les lymphokines, sous-classe des cytokines, sont un ensemble de protéines produites par des lymphocytes activant le système immunitaire *via* la signalisation des cellules exprimant leurs récepteurs à leur surface. Leurs

rôles peuvent être divers, allant de l'attraction d'autres cellules immunitaires au site d'infection à l'activation des macrophages.

I.1.c. Les différentes sortes d'interférons

L'interféron est la première cytokine découverte. Le terme cytokine, inventé par Cohen en 1974, vient du grec *cyto* - cellule et *kinos* - mouvement. Ce sont des molécules de communication, solubles, secrétées dans le milieu extracellulaire et agissant sur d'autres cellules pour réguler leur activité et leur fonction. Leur action peut être paracrine, endocrine ou encore autocrine *via* l'interaction avec un récepteur présent sur la surface des cellules cibles.

Les différents interférons sont aussi classés selon leur récepteur spécifique. Une liste des interférons retrouvés chez l'homme est fournie en tableau 1 et leur schéma de signalisation en figure 1.

- **L'interféron de type I : la première découverte**

L'interféron de type I renferme le plus grand groupe d'interférons, neuf ont déjà été identifiés (α , β , δ , ϵ , κ , λ , ω , τ , ϖ). Leur récepteur (R) unique est un hétéro-dimère composé de deux polypeptides, IFN α R1 et IFN α R2. La transmission du signal s'effectue par l'interaction de ces interférons avec ce récepteur, qui active la protéine kinase JAK1 (janus kinase 1) et la tyrosine kinase 2 (TYK2). La cascade de signalisation se poursuit par l'activation de IRF9 (Interferon Regulatory Factor 9) ou de STAT (Signal Transduction and Activation of Transcription). Les protéines STAT impliquées dans la signalisation des IFN de type I sont généralement STAT1 et STAT2 qui forment des homodimères après leur activation. Ces facteurs de transcription (IRF9 et l'homodimère STAT1/STAT2) se déplacent dans le noyau où ils lient les séquences ISRE (Interferon Stimulated Response Element » (ISRE) déclenchant ainsi la transcription des gènes nommés IGS (Interferon Stimulated Gene).

Bien que neuf IFN de type I soient connus aujourd'hui, l'IFN α et IFN β , découvert en premier, restent les mieux caractérisés et sont, immunologiquement parlant, les plus pertinents. L'IFN α est exprimé par les leucocytes et essentiellement impliqué dans l'immunité innée contre des infections virales, douze sous-types humains sont décrits [13]. L'IFN β est sécrété en grande quantité par les fibroblastes et est également impliqué dans l'immunité innée, seuls deux sous-types sont décrits. IFN ϵ , - κ , - τ , et - ζ ont été décrits chez les

mammifères mais seul l'IFN κ est retrouvé chez l'homme. L'IFN ω a une seule forme fonctionnelle chez l'humain mais plusieurs pseudogènes ont été identifiés. Il en est de même pour l'IFN ν qui n'a pour l'instant été identifié qu'en tant que pseudogène que chez l'homme [14-16].

- **L'interféron de type II : l'interféron gamma**

L'interféron gamma est le seul type d'IFN de type II; une présentation complète de son expression, son récepteur, sa cascade de signalisation et ses activités sera fournie en paragraphe I.5.

- **L'interféron de type III : une découverte récente**

En 2003, une nouvelle classe d'interférons a vu le jour : les IFN de type III. Elle était à cette époque uniquement représentée par un seul sous-type, l'IFN λ [16-18]. Trois d'entre eux sont connus aujourd'hui, l'IFN λ 1, l'IFN λ 2, et l'IFN λ 3 également appelés respectivement IL29, IL28A et IL28B. Cette double nomenclature démontre encore une fois la similitude entre les interleukines et les interférons.

IFN class	IFN	Gene locus	Primary source	Function	Receptor	Signal transduction pathways
Type I	IFN- α	9p21 + 3	Plasmacytoid Dendritic Cells (PDCs)	Antiviral, cytotoxic, anti-tumoral, pro-apoptotic, antiproliferative	IFNAR 1/2 (Ubiquitously expressed)	Jak1, Tyk1, Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5, NF- κ B, MAPK, p53
	IFN- β	9p21 + 3	Fibroblasts/DCs			
	IFN- ϵ	9p21 + 3	Cells of central nervous system and female reproductive organs			
	IFN- κ	9p21 + 1	Keratinocytes			
Type 2	IFN- ω	9p21 + 3	Plasmacytoid DCs	Antiviral, antibacterial, antitumoural	IFNGR1/2 (Ubiquitously expressed)	Jak1, Jak2, Stat1, Stat3, Stat5
	IFN- γ	12q14 + 3	Natural killer cells T cells Macrophages			
Type 3	IFN- λ 1 (IL-29)	19q13 + 2	Plasmacytoid DCs	Antiviral, antibacterial, anti-tumoural, pro-apoptotic, anti-proliferative	IFNLR1/IL-10R2 (Epithelial cells and hepatocytes)	Jak1, Tyk2, Stat1, Stat2, Stat3, Stat5
	IFN- λ 2 (IL-28A)	19q13 + 2	Plasmacytoid DCs			
	IFN- λ 3 (IL-28B)	19q13 + 3	Plasmacytoid DCs			

Tableau 1 : Liste des interférons trouvés chez l'homme.

Les différents interférons humains sont détaillés ainsi que leur localisation génique, leur source primaire, leur fonction, leur récepteur et leurs voies de signalisation utilisées.

D'après George *et al.*, 2012 [14].

Leur récepteur est un homodimère de l'IFN λ R1 et de l'IL10R2 (récepteur partagé entre IFN λ et IL10). Ce récepteur est uniquement exprimé par les hépatocytes et non de façon ubiquitaire comme c'est le cas pour les récepteurs d'IFN de type I et II [14]. Bien que ces récepteurs soient spécifiques, les voies de signalisation utilisées sont les mêmes que celles utilisées par les IFN de type I. Ainsi les IFN de type III ont certains effets en commun avec ceux de type I. En effet, ils ont une action antivirale, antiproliférative et anti-tumorale.

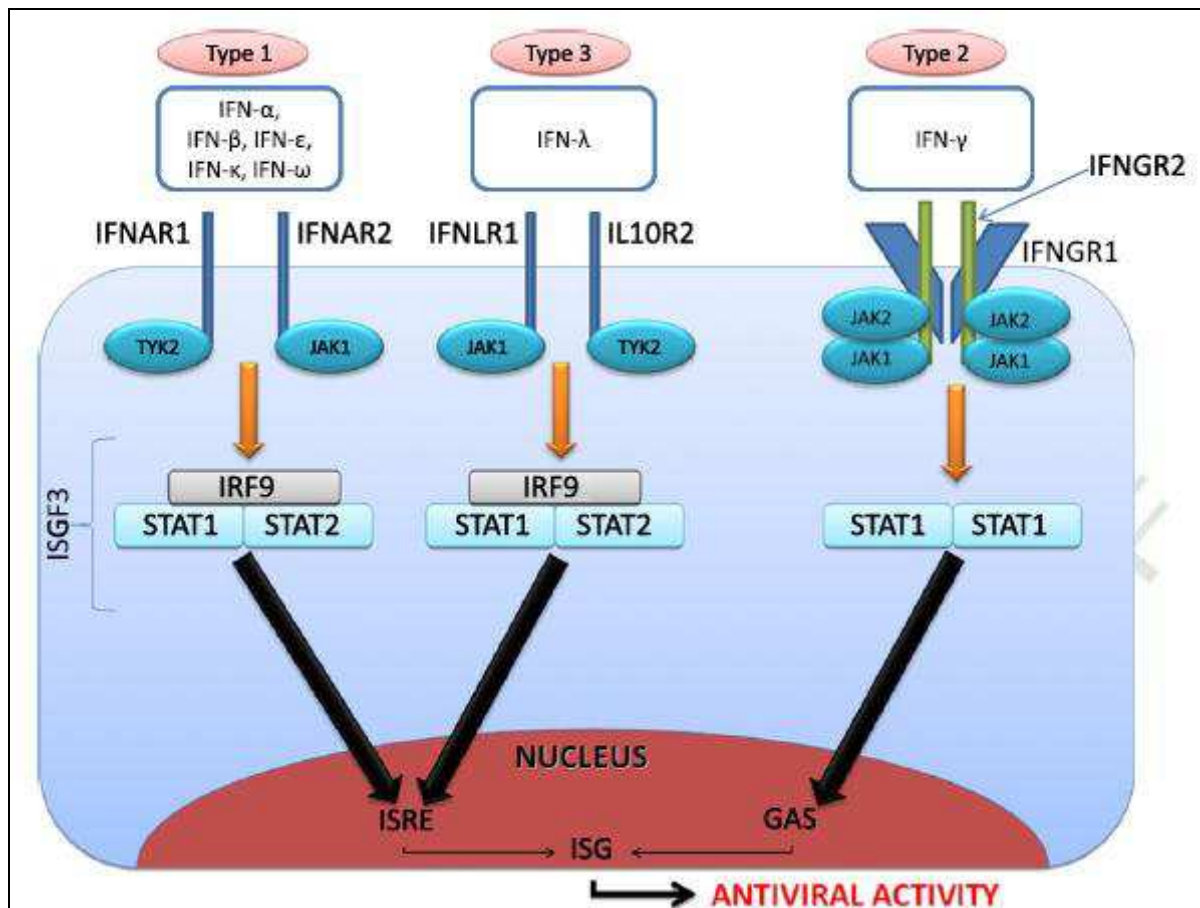


Figure 1 : Schéma de la signalisation des différents interférons.

L'interféron de type I fixe un récepteur présent sur la surface cellulaire. Ce récepteur est un homodimère composé d'un IFN α R1 et d'un IFN α R2. L'interaction des interférons de ce type avec leurs récepteurs provoque l'activation de JAK1 et de TYK2 qui enclenche une cascade de signalisation *via* IRF9 et STAT1/2 (ces derniers formant un hétérodimère). Ils sont alors transloqués dans le noyau où ils agissent en tant que facteurs de transcription liant des séquences ISRE et déclenchant la transcription des gènes ISG. Les interférons de type III lient leurs récepteurs, IFN λ R1 et IL10R2, et activent les mêmes voies de signalisation que celles de l'IFN de type I.

L'IFN γ , seul type d'IFN de type II, transmet ses signaux par un récepteur composé de deux IFN γ R α et de deux IFN γ R β (appelé ici IFN γ R1 et IFN γ R2 mais dans la suite du manuscrit appelé IFN γ R α et IFN γ R β). Cette interaction active JAK1 puis JAK2 qui activent à leur tour STAT1. L'activation de STAT1 provoque son homodimérisation et sa translocation vers le noyau où elle lie les séquences GAS (Gamma Activated Sequences) en provoquant la transcription des gènes.

D'après George *et al.*, 2012 [14].

I.1.d. *L'évolution de l'interféron gamma*

Les gènes codant pour des protéines impliquées dans le système immunitaire sont particulièrement soumis à la sélection pendant l'évolution. Pour cette raison peu de similitudes entre des gènes d'IFN identifiés à ce jour sont observées. Ceci rend l'identification de ces gènes chez d'autres espèces, en particulier chez les non vertébrés, plus difficiles.

L'origine de l'IFN γ est révélée plus tôt que précédemment postulée, associée avec l'apparition des vertébrés, il y a environ 450 millions d'années et non avec celui des

tétrapodes (figure 2). Elle est même soupçonnée être antérieure (vers 560 millions d'années) du fait de l'identification des gènes codant pour l'IFN γ R et de l'IL10 chez les requins [19]. Aucun gène, proche de celui de l'IFN γ n'a pu être identifié chez les non vertébrés. Un gène similaire à celui de l'IFN γ est par contre identifié chez le poisson zèbre et le poisson-ballon. Il est nommé « IFN γ -related gene » en attendant une caractérisation plus précise [17].

La régulation de l'expression est très similaire entre les différentes espèces. Effectivement, la séquence promotrice, connue pour lier différents facteurs de transcription, reste conservée chez les vertébrés. De plus l'alignement de séquences présuppose la présence d'autres facteurs encore non-associés à l'expression de l'IFN γ . La régulation post-traductionnelle reste également conservée car les séquences 3-UTR (3-untranslated region) contenant les séquences ARE (Adenylate-uridylate-Riche Elements) sont hautement conservées.

La structure de l'IFN γ est résolue chez les mammifères seulement. Leur superposition démontre une forte conservation de celle-ci. La faible similarité en séquence primaire entre les orthologues rend la modélisation computationnelle extrêmement difficile. Par conséquence, les structures pour les orthologues non-mammifères restent inconnues. Par contre, l'alignement des séquences non-mammifères ainsi que les prédictions de structures secondaires supposent un repliement et une structure analogue à celle de mammifères.

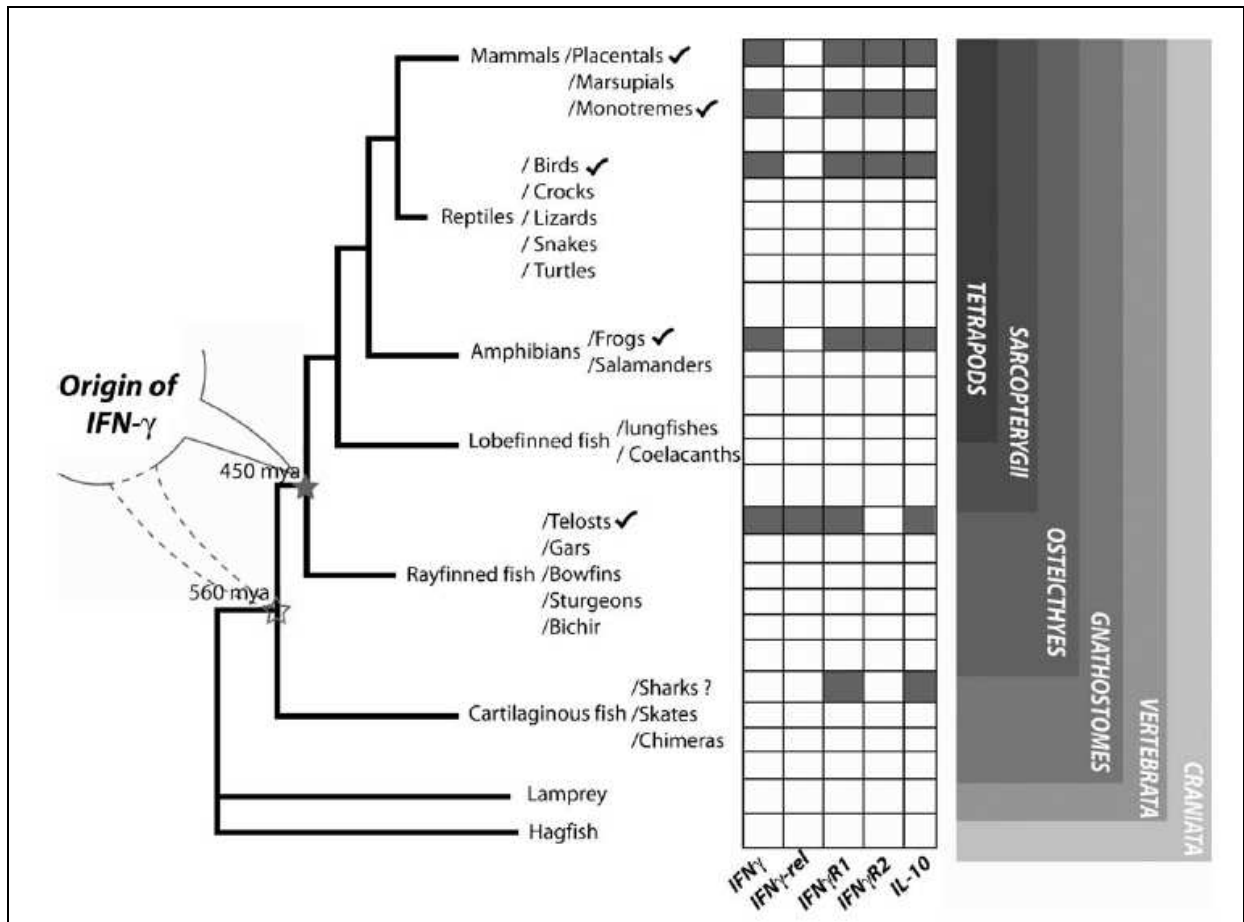


Figure 2 : Schéma représentant l'origine de l'IFN γ .

L'origine de l'IFN γ est postulée chez les vertébrés (450 millions d'années) plutôt que chez les tétrapodes (380 million d'années), comme précédemment proposé, basé sur la présence du gène codant pour l'IFN γ R. La présence du gène est indiquée par un carré noir et l'absence ou l'absence de l'identification à cause du manque d'information génomique par un carré blanc.

D'après Savan *et al.*, 2009 [18].

I.2. L'expression de l'interféron gamma

I.2.a. Les cellules exprimant l'interféron gamma

• Les effecteurs de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée doivent répondre rapidement aux pathogènes et former une première ligne de défense. En effet, les cellules de l'immunité adaptative, répondant aux antigènes spécifiques, nécessitent un certain délai à cause de leur différenciation en cellules actives. C'est pour cette raison que les cellules NK tuent les cellules étrangères à l'organisme par la sécrétion de granules cytotoxiques de manière indépendante de l'antigène. De plus les cellules NK et NKT expriment rapidement l'ARNm de certaines cytokines, comme l'IFN γ . Elles déclenchent ainsi la sécrétion de l'IFN γ dans les minutes qui suivent l'infection. Ces cellules contiennent également des réserves d'IFN γ intracellulaire qui peuvent être secrétées

en attendant son expression. Cet IFN γ secrété contribue de façon directe et indirecte à la réponse immunitaire. (Voir également paragraphe I.5) [19-21].

- **Les effecteurs de l'immunité adaptative**

Contrairement aux cellules NK et NKT, les cellules de l'immunité adaptative expriment l'IFN γ en grande quantité uniquement quelques jours après l'infection. Effectivement, l'expression de l'IFN γ n'est amorcé que par l'action de facteurs de transcription ou par le remodelage de la chromatine à la suite de la maturation des cellules de l'immunité adaptative (cellules CD8 $^{+}$ et cellules CD4 $^{+}$ Th1 dans le cas de l'IFN γ) [19].

Les cellules CD8 $^{+}$ tuent les cellules infectées ou les pathogènes, par la sécrétion des granules cytotoxiques, après stimulation des cellules CD8 $^{+}$ par ces antigènes. Elles produisent également de grandes quantités d'IFN γ après activation de leur récepteur aux cellules T (TCR) ou en réponse aux cytokines, IL12 et IL18.

Les cellules CD4 $^{+}$ Th1 produisent aussi de l'IFN γ . Contrairement aux cellules CD8 $^{+}$, les cellules CD4 $^{+}$ Th1 stimulent d'autres cellules immunitaires par la sécrétion de cytokines. Elles dirigent ainsi la réponse immunitaire vers la phagocytose et l'apoptose *via* l'activation des cellules T cytotoxiques et des macrophages [23, 26-27]. Par ailleurs, l'IFN γ inhibe les cellules CD4 $^{+}$ Th2 (produisant de l'IL4 et de l'IL5) et oriente ainsi la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire, plutôt que humorale.

Plus récemment, l'expression de l'IFN γ par des lymphocytes B et d'autres cellules présentatrices d'antigènes a été démontrée. L'IFN γ secrété par les macrophages peut augmenter leur capacité à tuer des pathogènes, même s'il n'est exprimé qu'en quantité minime. L'IFN γ produit par les cellules dendritiques ou les cellules B peuvent, en plus des actions biologiques connues de l'IFN γ , influencer la différenciation des cellules T [22-23]

I.2.b. Les signaux déclenchant l'expression de l'IFN γ

L'IFN γ est exprimé par les cellules nommées ci-dessus *via* des stimuli lors de la réponse immunitaire. Par contre il est difficile, voire impossible, de différencier les signaux déclenchant l'expression de l'IFN γ de ceux augmentant l'expression de celui-ci car souvent la coopération de différents facteurs mène à son expression. D'autre part, de très faibles quantités d'IFN γ peuvent être retrouvées en l'absence de signaux déclenchant son expression [24].

- **Les stimuli exogènes**

Les cellules endommagées, infectées ou transformées expriment à leur surface des indicateurs de stress. Des récepteurs spécifiques présents sur les cellules de l'immunité reconnaissent ces ligands et déclenchent l'expression d'IFN γ . Le taux d'expression et la nature de ces récepteurs varient selon la cellule activée. Par exemple, sur les cellules CD4⁺ Th1, les cellules CD8⁺ et les cellules NKT se trouvent les TLR (Toll Like Receptor) réagissant à ce stress. Les cellules NK, quant à elles, sont activées par des récepteurs comme Ly49, NCR, NKG2 ou CD16.

Les signaux de stress reconnus par ces récepteurs, décrit dans le paragraphe précédent, sont très variables. Ce sont, entre autres, des peptides produits par les cellules T et présentés par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC) comme non-soi, des lipopolysaccharides, des lectines végétales, des super antigènes ou encore directement des pathogènes comme par exemple la reconnaissance des membranes externes des bactéries gram négatif.

Une diminution des MHC classe I est souvent provoquée dans les cellules qui subissent un stress comme dans des cellules endommagées, infectées ou transformées. La vérification du taux d'expression des MHC classe I sur la surface cellulaire permet à la cellule la vérification de la validité de ces stimuli exogènes.

- **Les stimuli endogènes**

D'autre part, des stimuli endogènes peuvent déclencher ou contribuer à l'expression de l'IFN γ par interaction avec leurs récepteurs présents sur les cellules cibles. Il est à noter que les cytokines secrétées par les cellules infectées ou présentant des antigènes peuvent soit réprimer soit activer son expression.

Concernant les facteurs activant l'expression de l'IFN γ , l'IL12 est la cytokine la plus connue. En interagissant avec son récepteur, l'IL12 active STAT4 déclenchant ainsi l'expression de l'IFN γ . De plus, par le biais d'une augmentation de l'expression des récepteurs CD44 et CD28, l'IL12 peut également indirectement augmenter l'expression de l'IFN γ . L'IL12 ne déclenche pas uniquement l'expression de l'IFN γ mais elle joue également un rôle important dans l'activation des cellules NK et dans la différenciation des cellules T vers les cellules CD4⁺ Th1. Une autre cytokine provoquant une forte augmentation de l'expression de l'IFN γ est l'IL18 par le biais de l'activation des facteurs de transcription NF κ B et MAPK. D'autres cytokines comme, l'IL2, l'IL15, les interférons de type I et le TNF α peuvent également augmenter son expression. Souvent une synergie entre ces cytokines est nécessaire pour

induire une expression considérable de l'IFN γ . Enfin, nous pouvons également noter une rétroaction positive de l'IFN γ particulièrement importante pour les cellules CD4⁺ Th1.

Les facteurs réprimant l'expression sont essentiels puisqu'un excès ou une prolongation de la production d'IFN γ peut causer des pathologies inflammatoires et auto-immunes. Ces facteurs peuvent eux-mêmes réprimer le gène en question ou peuvent inhiber l'expression de facteurs de transcription activant ce gène. Le TGF β (transforming growth factor β), l'IL10, l'IL4 et l'IL6 sont connus dans la répression de l'expression de l'IFN γ ainsi que dans l'inhibition de la polarisation de cellules CD4⁺ vers Th1.

Un équilibre de ces cytokines secrétées est notamment important pour les cellules T. Selon le profil de cytokines, elles se différencient en cellules CD4⁺ Th1, cellules CD4⁺ Th2 ou encore en cellules CD4⁺ Th17 [19].

1.2.c. Les modulateurs de l'expression de l'IFN γ

Une fois que les récepteurs des cellules sont activés, une cascade de signalisation est déclenchée menant finalement à l'expression de l'IFN γ . Différentes modulation de son expression ont été décrites. La plus connue et la plus importante est sans doute l'action des facteurs de transcription. Cependant le contrôle épigénétique et post-traductionnel est également à prendre en compte.

- **Les facteurs de transcription**

Les facteurs de transcription activent la transcription du gène auquel ils sont complexés soit par recrutement du complexe de l'ARN-polymérase soit par recrutement des protéines modifiant la structure de la chromatine rendant le gène en question plus accessible à l'ARN-polymérase.

La régulation de la transcription de l'IFN γ est complexe car l'analyse génomique identifie de nombreuses séquences, présentes dans le promoteur et les introns de l'IFN γ , connues pour lier des facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription peuvent agir en tant qu'activateurs ou répresseurs de la transcription. Une liste de ces derniers régulant la transcription de l'IFN γ est présentée sur le tableau 2.

Facteur de transcription	Région liée	Effet
AP-1	IFN Γ promoteur IFN γ CNS-6	A
ATF2/c-Jun	IFN Γ promoteur	A
C/EBP	IFN Γ promoteur	A
Ets-1	IFN γ promoteur	A,E
NFAT	IFN Γ /IFN γ promoteur IFN γ CNS-6	A
NFκB	IFN γ promoteur IFN Γ /IFN γ promoteur IFN Γ Intron 1	R A A
Runx3	IFN γ promoteur	A
T-bet	IFN Γ /IFN γ promoteur IFN γ cns- 54,34,22,6,18/20	A,E
STAT 1,3,4,5	IFN Γ promoteur IFN Γ Intron 1 IFN Γ CNS	A
STAT 6	IFN γ promoteur	R
CREB/ATF1	IFN Γ promoteur	R
YY1	IFN Γ /IFN γ promoteur	A,R
SMAD3	IFN Γ promoteur	R
GATA-3	IFN Γ /IFN γ promoteur IFN γ CNS-54	R

Tableau 2 : Liste des facteurs de transcription interagissant avec le gène de l'IFN γ .
 IFN Γ indique un gène humain et IFN γ indique un gène de la souris. A = (co)-activateur, R = (co)-répresseur et E = induction de modifications épigénétiques.

D'après Schoenborn *et al.*, 2007 [19].

- **Le contrôle épigénétique**

Malgré l'importance des facteurs de transcription pour la régulation de l'expression de l'IFN γ , d'autres niveaux de contrôle de l'expression existent. En effet, des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN ou la composition de nucléosomes, modulent la fixation des facteurs de transcription ainsi que l'initiation et la progression de la transcription (figure 3). Ce code épigénétique module donc l'expression des protéines.

Ces modifications épigénétiques sont notamment importantes dans les cellules CD4+. En effet l'activation de l'expression d'IFN γ ne provoque qu'une faible expression de celui-ci par les cellules CD4+ Th2. Ceci est dû à un changement épigénétique, des méthylations à proximité du promoteur de l'IFN γ , durant l'engagement vers une réponse de type Th2 qui rends le locus de l'IFN γ moins accessible pour les activateurs de transcription [25]. Au contraire, des cytokines menant vers une réponse de type Th1 entraînent des modifications activant l'expression [19, 25].

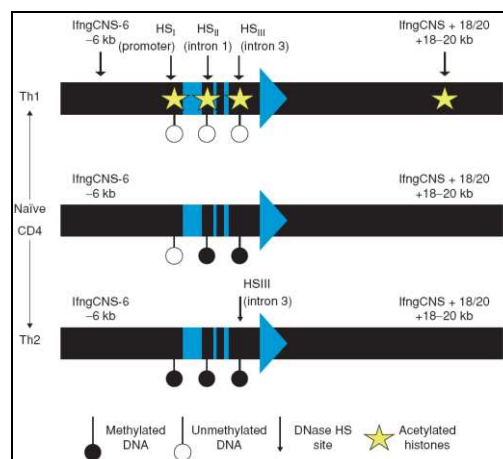


Figure 3 : Contrôle épigénétique de l'expression de l'IFN γ dans les cellules CD4+.

La différenciation des cellules CD4+ vers Th1 enlève les méthylations de l'ADN et les acétyles des histones sur le gène codant pour l'IFN γ et sur les loci le précédant. Ceci augmente le potentiel d'expression de l'IFN γ . La différenciation induit également la présence de sites sensibles à la DNaseI. Au contraire, une différenciation vers Th2 provoque des méthylations réprimant le potentiel d'expression de l'IFN γ .

D'après schoenborn *et al.*, 2007 [19].

- **Le contrôle post-transcriptionnel**

Après transcription du gène codant pour l'IFN γ , l'expression peut être encore modulée notamment par la stabilisation de l'ARNm. Comme pour d'autres cytokines, la présence des ARE dans le 3-UTR de l'IFN γ contribue à la stabilité de l'ARNm par l'interaction de ceux-ci avec des protéines qui n'ont pas encore été identifiées [26-27]. De plus, on suppose un contrôle supplémentaire par des microARN pour l'expression de l'IFN γ car la suppression de l'expression de dicer (enzyme essentielle dans la production des microARN) augmente le taux d'expression d'IFN γ dans les cellules CD4+ Th1 [26, 28].

I.3. Du gène à la protéine

I.3.a. Le gène codant pour l'IFN γ

Le gène codant pour l'IFN γ se positionne sur la bande chromosomique 12q15 à proximité des microsatellites D12S335 et D12S313 [29]. L'ADNc de l'IFN γ a pour la première fois été purifié et caractérisé en 1982 par Derynck *et al.* [30]. Ce qui a démontré que le gène codant pour l'IFN γ a peu de similarité avec les gènes codant pour les autres interférons : tout d'abord ce gène contient trois introns absents chez les gènes codant pour les autres interférons, ensuite il se trouve sur le chromosome 12, et pour les IFN γ α et β sur le chromosome 6 pour les IFN α et β [9, 31].

Ce gène est composé de 6 kilo bases ainsi que d'une séquence promotrice comportant une boîte TATA et une séquence servant de site de reconnaissance à l'ARN polymérase. Des séquences homologues à celles qui précèdent les gènes codant pour l'IFN α et l'IFN β sont identifiées dans la région promotrice, supposant une similarité dans la régulation de leur expression.

I.3.b. La voie de synthèse

Après divers stimuli, décrits en paragraphe I.2.b, une cascade de signalisation par la phospholipase C est initiée. Cette dernière hydrolyse la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (IP) libérant ainsi du 1,4,5-inositoltriphosphate (IP3) et le 1,2-diacylglycerol (DAG). L'IP3 migre ensuite dans le cytosol où il augmente la concentration de calcium intracellulaire, libéré par le réticulum endoplasmique. Le DAG reste associé à la membrane et augmente l'activité de la protéine kinase C (PKC) en présence des ions calcium libérés. L'activation de la PKC induit des cascades de phosphorylation conduisant à l'expression de l'IFN γ [32].

I.3.c. La séquence primaire de l'IFN γ

La séquence primaire de l'IFN γ mature contient 143 acides aminés (AA) avec une MM théorique de 17,1 kDa. Un peptide signal de 20 AA la précède du côté N-terminal entraînant la sécrétion de l'IFN γ . L'IFN γ ne contient aucun résidu de cystéine et est par conséquent dépourvu de ponts disulfures.

L'IFN γ possède des sites de N-glycosylation en position asparagine 25 et asparagine 97. Trois formes différentes coexistent *in vivo* : l'IFN γ non-glycosylé, partiellement glycosylé et

totalement glycosylé (figure 4). Ces glycosylations augmentent le taux de repliement, la dimérisation, la sécrétion et la protection contre la dégradation protéolytique. Toutes ces formes s'avèrent actives [33-34].

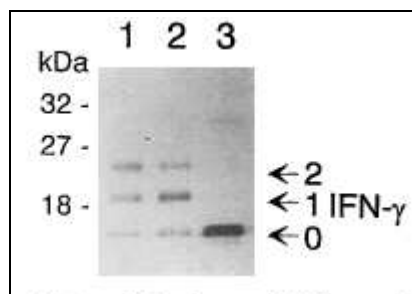


Figure 4 : Analyse par western blot d'IFN γ produit par des leucocytes.

L'IFN γ purifié à partir de leucocytes humains (ligne 1), traité avec l'endoglycosydase H (ligne 2) et avec la N-glycosydase F (ligne 3) est séparé par SDS-PAGE. L'IFN γ purifié est hétérogène, correspondant à une forme non- (0), mono- (1) et di-glycosylé (2), ceci est démontré par l'action de la N-glycosydase F provoquant l'apparition d'une seule bande.

D'après Sareneva *et al.*, 1996 [35].

I.3.d. *La structure de l'IFN γ*

La structure de l'IFN γ (illustré sur la figure 5) a tout d'abord été élucidée par cristallographie aux rayons X avec une faible résolution (3,5 Å) à partir de l'IFN γ non glycosylé. Peu de temps après, cette structure fut confirmée par celle obtenue par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en trois dimensions (^1H , ^{13}C et ^{15}N) [36-37]. Plus récemment une structure cristallographique de haute résolution (2,0 Å) de l'IFN γ complexé avec la partie extracellulaire de l'IFN $\gamma\text{R}\alpha$ glycosylé a été obtenue [38] après celle à plus basse résolution avec de l'IFN $\gamma\text{R}\alpha$ non glycosylé [39].

L'IFN γ est un homodimère dans lequel les deux polypeptides sont agencés de façon tête bêche formant un dimère globulaire en forme de V. De ce fait, le domaine C-terminal d'un monomère se trouve à proximité de l'extrémité N-terminale de l'autre. Chaque monomère est composé de six hélices α (nommées de A à F) reliées entre elles par des boucles. Le dimère a une forme ovoïdale avec des dimensions globales de 60 Å par 40 Å et par 30 Å. L'intercalation des hélices α maintient cet homodimère. La partie C-terminale (résidus 126-143) est hautement hydrophile et non structurée. Elle est par conséquent non visible dans la structure cristallographique mais semble s'éloigner du corps protéique [40]. Cette partie est également très importante car sa dégradation partielle change l'activité biologique de la cytokine (paragraphe III.5.a). Elle pourrait interagir avec une partie du récepteur (paragraphe I.4b) et constitue *a priori* le site d'interaction avec les HS (paragraphe III.5.a) [36-37].

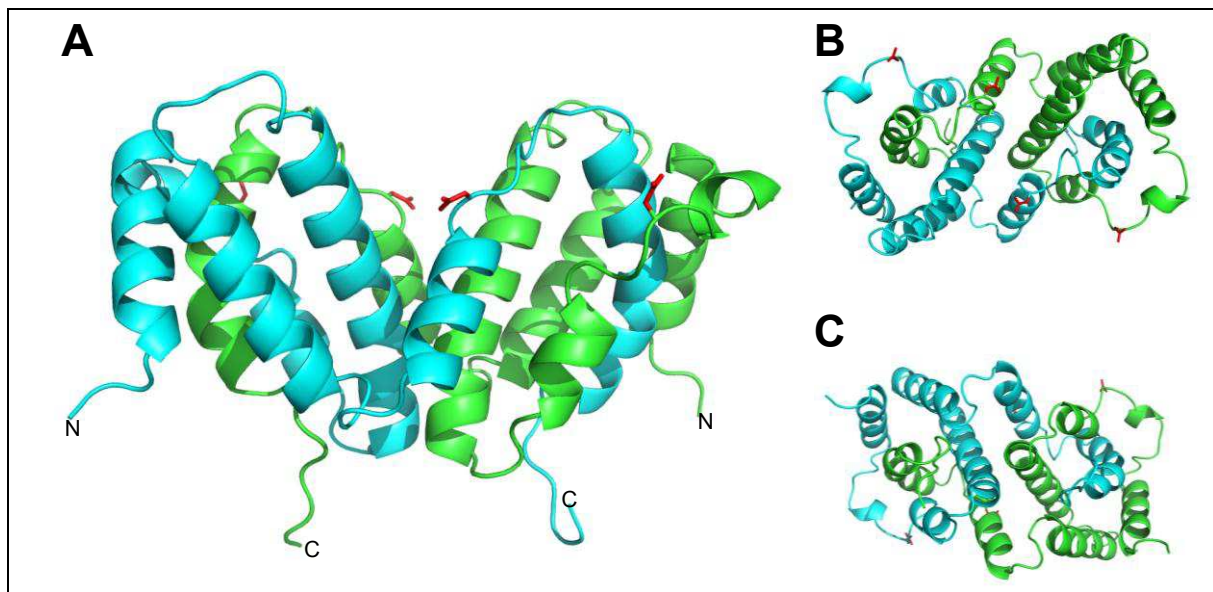


Figure 5 : Structure de l'IFN γ .

Sur cette figure l'homodimère de l'IFN γ est illustré avec une couleur par monomère. Les sites de glycosylation, Asn 25 et Asn 97, sont indiqués en rouge. Le domaine C-terminal (résidus 126-143) est absent sur cette figure. Cette structure est extraite de la structure du complexe de l'IFN γ avec la partie soluble extracellulaire de l'IFN γ R α . En A : la structure « vue de face » en B « vue de dessus » et en C « vue de dessous ».

D'après Walter *et al.*, 1995 [39].

I.4. Le récepteur

I.4.a. La structure du récepteur

Le récepteur de l'IFN γ est composé de deux protéines: IFN γ R α et IFN γ R β , toutes deux membres de la famille des récepteurs des cytokines de classe 2 (figure 6). Ces récepteurs sont composés d'une région cytoplasmique, d'une partie extracellulaire glycosylée et d'un peptide transmembranaire unique. La partie intracellulaire contient des sites de liaison pour JAK1 et STAT1 sur l'IFN γ R α et pour JAK2 sur l'IFN γ R β [39, 41]

Seule la structure de la partie extracellulaire de l'IFN γ R α a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Cette partie contient deux domaines globulaires de type fibronectine III, composés de deux feuillets β maintenus ensemble par des ponts disulfures et connectés par une boucle de 11 résidus [39].

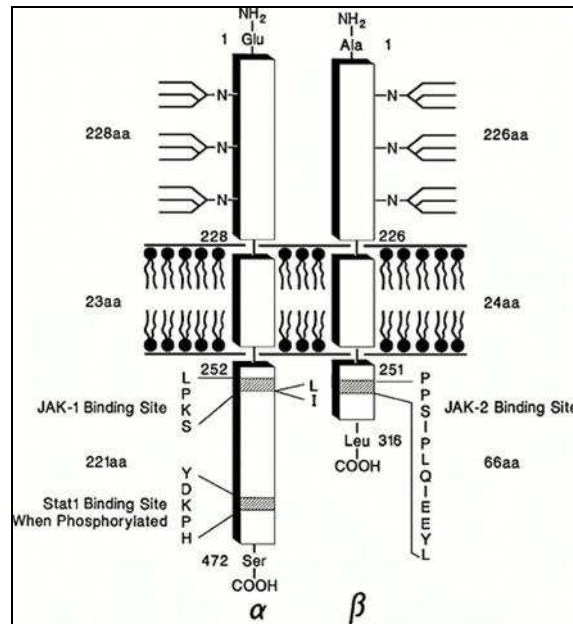


Figure 6 : Structures des polypeptides récepteurs de l'IFN γ .

Le récepteur de l'IFN γ est composé de deux chaînes : IFN γ R α et IFN γ R β . L'IFN γ R α est une glycoprotéine de 90 kDa nécessaire à la liaison avec l'IFN γ , et l'IFN γ R β une glycoprotéine de 62 kDa essentielle pour la transmission de signaux. Les parties intracellulaires de l'IFN γ R α contiennent des sites de liaison pour JAK1 (séquence LPKS) et pour STAT (séquence YDKPH) et l'IFN γ R β contiennent ceux de JAK2 (séquence PPSIPLQIEEYL).

D'après Shankaran *et al.*, 2000 [41].

I.4.b. L'interaction du récepteur avec l'IFN γ

L'IFN γ transmet ses signaux *via* l'interaction avec son récepteur spécifique présent sur les cellules cibles. L'affinité de l'IFN γ pour son récepteur est de l'ordre de 1 à 10 nM. Ceci a été déterminée par des essais immunochimiques et à l'aide de ligands radio-marqués [42-43]. De plus, ce récepteur est spécifique pour chaque espèce car l'IFN γ humain n'est pas capable d'induire la signalisation *via* l'IFN γ R issue de souris et vis versa.

Ce récepteur est composé de deux chaînes, l'IFN γ R α et l'IFN γ R β mais c'est uniquement l'IFN γ R α qui interagit directement avec l'IFN γ . L'IFN γ R β ne semble pas interagir de façon directe avec l'IFN γ mais a un rôle essentiel dans la transmission des signaux [41].

La détermination de la structure par cristallographie du complexe IFN γ :IFN γ R α confirme que chacun des monomères de l'IFN γ interagit avec une chaîne d'IFN γ R α de façon symétrique (figure 7). Les résidus de l'IFN γ impliqués dans l'interaction avec l'IFN γ R α sont localisés dans les régions 1-42 et 108-124. Cette première région comporte l'hélice A, la boucle AB et l'hélice B. La deuxième région comporte l'hélice F et une partie de la séquence C-terminale de l'IFN γ [38-39, 44-45].

La partie C-terminale de l'IFN γ , à partir du résidu 126, n'est pas visible sur la structure du complexe du fait de sa flexibilité. Aucune interaction directe avec l'IFN γ R n'est de ce fait identifiée à partir de la structure du complexe. Cependant, il est démontré que cette partie basique influence la liaison de l'IFN γ avec le récepteur. C'est pourquoi qu'il soit possible que ce domaine C-terminal lie un groupement d'AA acides présent à la surface de l'IFN γ R α [39, 46-47].

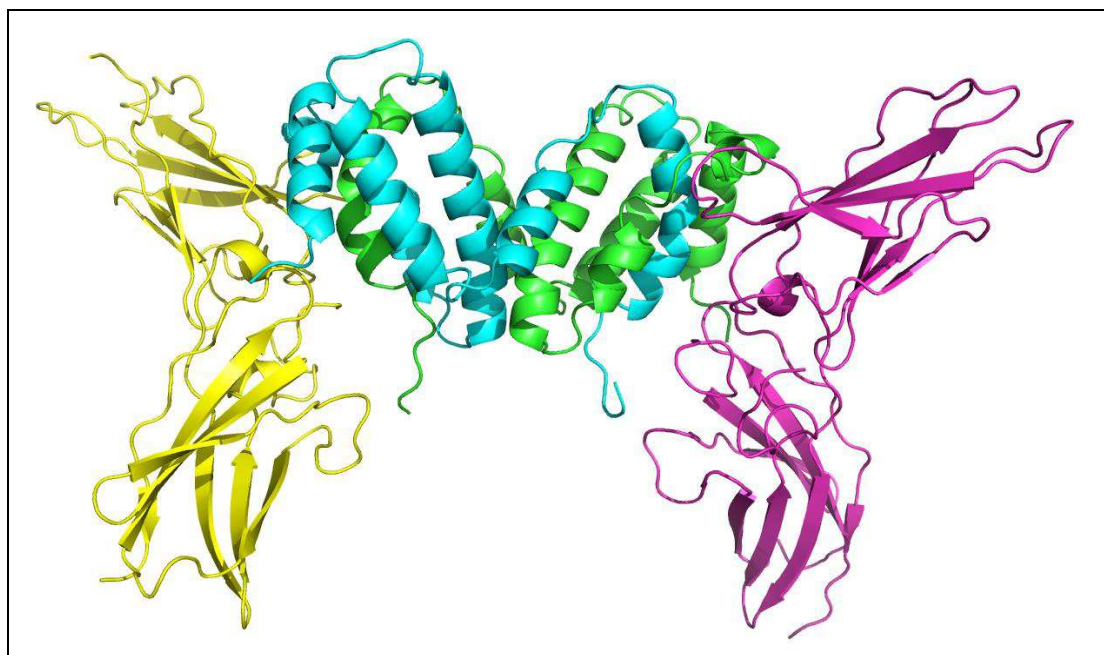


Figure 7 : Structure moléculaire de l'IFN γ complexé avec l'IFN γ R α .

L'IFN γ non-glycosylé est cristallisé en complexe avec la partie extracellulaire de l'IFN γ R α . Le dimère de l'IFN γ (illustré en vert et bleu) interagit avec une chaîne de l'IFN γ R α (illustré en rose et jaune). La partie C-terminale de l'IFN γ (résidus 126-143) est absente sur cette figure.

D'après Walter *et al.*, 1995 [39].

1.4.c. L'expression du récepteur

L'IFN γ R α est ubiquitairement exprimé (hormis par les érythrocytes) et semble être non-régulé par des stimuli externes. Pourtant, le nombre des IFN γ R α présents sur la surface cellulaire varie considérablement selon les types cellulaires : entre 250 et 25 000 IFN γ R α peuvent y être retrouvés. Cette différence n'est cependant pas corrélée avec l'amplitude de signal après stimulation par l'IFN γ . [42, 48]

L'expression de l'IFN γ R β est, quant à elle, régulée dans certains types cellulaires. Par exemple, il est observé que dans les cellules T, l'IFN γ diminue l'expression des IFN γ R β modulant de ce fait le nombre d'IFN γ R actif présent à la surface cellulaire. La façon et la durée avec laquelle ces cellules répondent à un stimulus de l'IFN γ sont ainsi régulées [42, 48-49].

I.4.d. Pré-assemblage du récepteur à la surface cellulaire

Au vue de la composition du récepteur actif de l'IFN γ (un hétéro-tétramère de deux IFN γ R α et de deux IFN γ R β), la question de savoir dans quel état ce récepteur se trouve à la surface cellulaire avant l'interaction avec l'IFN γ se pose. Est-ce que les différents composants du récepteur se trouvent isolés sur la surface cellulaire et s'assemblent lors de l'interaction de l'IFN γ avec l'IFN γ R α ? Ou est-ce que la forme active du récepteur est préformée avant l'interaction avec l'IFN γ ? Des expériences d'immunoprécipitation et de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) suggèrent que le récepteur est en effet préformé [50-51]. De plus, à partir de la technique FRET, permettant une visualisation directe, il a été démontré que l'interaction de l'IFN γ avec son récepteur éloigne les parties intracellulaires de l'IFN γ R α et l'IFN γ R β , augmentant ainsi l'accessibilité des molécules de signalisation (JAK1, JAK2 et STAT1) [51], comme illustré sur la figure 8.

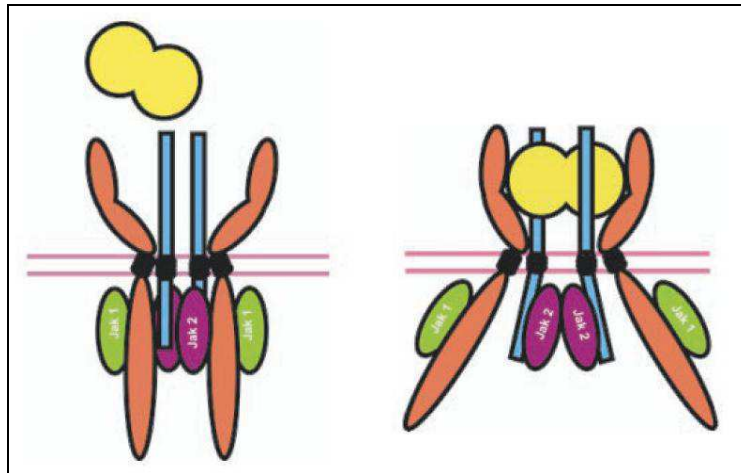


Figure 8 : Changement du conformation de l'IFN γ R lors de son interaction avec l'IFN γ .

Le récepteur de l'IFN γ est préassemblé et composé de deux chaînes IFN γ R α et de deux chaînes IFN γ R β . Lorsque l'IFN γ lie son récepteur, les parties intracellulaires de ce dernier s'ouvrent. Cette ouverture augmente l'accessibilité des sites d'interaction pour les molécules de signalisation de l'IFN γ .

D'après Sakatsume *et al.*, 2002 [50].

I.5. Signalisation

I.5.a. La voie de signalisation JAK-STAT

La voie de signalisation principalement utilisée par l'IFN γ est la cascade de signalisation JAK-STAT. Cette voie de signalisation est également utilisée par cinquante autres cytokines. Cette cascade débute, après l'interaction de l'IFN γ avec son récepteur, par l'autophosphorylation de JAK2. Ce dernier est comme JAK1 préassocié au récepteur. Cette phosphorylation l'active et provoque la transphosphorylation de JAK1, phosphorylant à son

tour la tyrosine 440 de l'IFN γ R α . Cette dernière phosphorylation forme le site de liaison de STAT1 sur l'IFN γ R α . STAT1 est ainsi recruté et est alors phosphorylé sur la tyrosine 701, probablement par JAK2. Après sa phosphorylation, il se dissocie du récepteur et dimérise. Ces phosphorylations ont lieu la première minute suivant le stimulus par l'IFN γ . STAT1 peut être aussi phosphorylé sur le résidu de sérine 727. Cette phosphorylation supplémentaire n'altère ni la dimérisation, ni la dissociation de STAT1 avec l'IFN γ R mais elle exalte la signalisation. La régulation de cette phosphorylation forme un niveau de contrôle complémentaire aux signaux induits directement par l'IFN γ [52]. Un schéma de cette signalisation est fourni en figure 9.

Afin que STAT1 agisse comme facteur de transcription, il doit être transporté vers le noyau. Deux modèles pour l'entrée de STAT1 dans le noyau existent. Le premier propose une complexation avec l'importin- α -1, qui dirige la translocalisation *via* un pore nucléaire [53]. Le second met en œuvre l'interaction de STAT1 avec l'IFN γ . Les signaux de localisation nucléaire (NLS) présents dans le domaine C-terminal de l'IFN γ permettrait l'entrée du dimère de STAT1 dans le noyau [54].

Dans le noyau, STAT1 lie les GAS par lesquelles il active ou inhibe l'expression des gènes régulés par l'IFN γ . Les premières protéines s'expriment 15 à 30 min après stimulation par l'IFN γ . Ce sont, pour la plupart, des facteurs de transcription induisant à leur tour l'expression d'autres gènes. [52, 55].

L'action de STAT1 est obligatoire mais parfois insuffisante pour induire l'expression de certains gènes. Effectivement, pour induire l'expression de certains gènes, STAT1 doit être associé aux autres facteurs de transcription, comme par exemple IRF9, des protéines de choc thermique etc. [52].

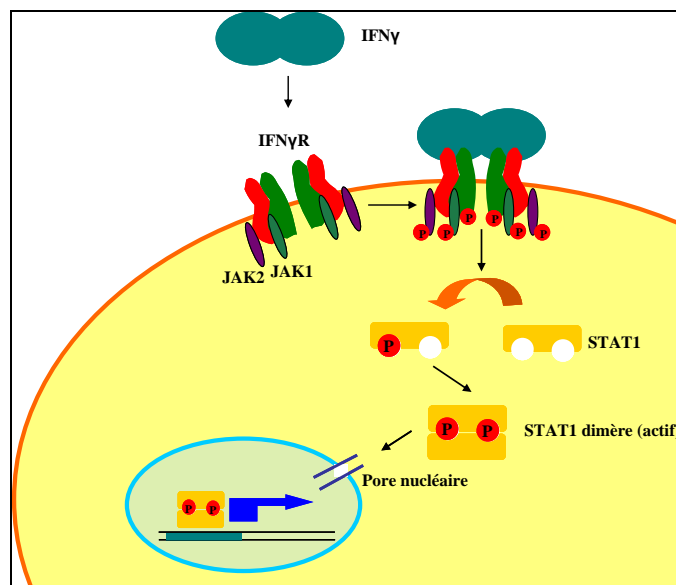


Figure 9 : Schéma de la cascade la signalisation de l'IFNγ par « JAK-STAT ».

Le dimère de l'IFNγ, sécrété dans l'espace extracellulaire, peut interagir avec son récepteur induisant ainsi une cascade de signalisation. Cette dernière débute par la transphosphorylation de JAK1 et JAK2 pré-associés au récepteur ainsi que la phosphorylation du récepteur. La phosphorylation du récepteur induit un site d'interaction pour STAT1 qui une fois associé au récepteur est phosphorylé. STAT1 phosphorylé se dissocie du récepteur et s'homodimérise. Cet homodimère se transloque dans le noyau où il active la transcription des gènes.

D'après Schroder *et al.*, 2004 [52].

I.5.b. Les cascades de signalisation alternatives

Un tiers des gènes pour lesquels l'expression est régulée par IFNγ le reste en l'absence de STAT1 [56-57]. Une compensation par d'autres STAT peut partiellement expliquer ceci, mais il est peu probable que cette compensation explique l'expression de tous ces gènes en l'absence de STAT1. Inévitablement des cascades de signalisation alternatives, parallèles à celles de STAT1, existent [55] (figure 10).

Avant tout, en dépit de la cascade de signalisation linéaire décrite dans le paragraphe ci-dessus, des alternatives à l'homodimérisation de STAT1 peuvent avoir lieu. D'autres STAT comme STAT3, 5 ou 2 sont activées ou forment des complexes actifs avec STAT1.

L'identification de protéines interagissant avec l'IFNγR comme SRC, PI3-K, c-Cbl et MyD88, démontre l'implication de cascades alternatives à la signalisation JAK-STAT. Ces cascades peuvent être totalement indépendantes de STAT1 ou exalter la signalisation de STAT1 par la phosphorylation de la serine 727. Quant aux cascades de signalisation alternatives, comme par exemple celles des protéines kinases ERK (extracellular signal-regulated kinase), elles sont activées par plusieurs intermédiaires, comme Rap1, Raf1 et PI3-K grâce à l'IFNγ [58-59]. L'implication d'autres MAP kinases, notamment p38 et JNK, reste

plus controversée. La signalisation par IKK/NF- κ B semble également importante dans certaines lignées cellulaires spécifiques [55, 60].

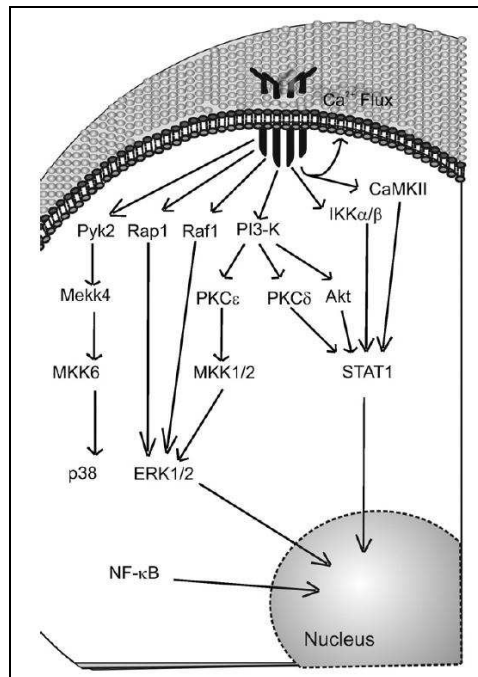


Figure 10 : Les cascades de signalisation alternative de l'IFN γ .

L'interaction de l'IFN γ avec son récepteur n'active pas seulement la voie de signalisation JAK-STAT mais également celle de ERK, celle de IKK/NF- κ B et probablement celle de p38 et de JNK.

D'après Gough *et al.*, 2008 [55].

1.5.c. Le contrôle sur la durée de la signalisation

Comme mentionné précédemment, une prolongation de la signalisation de l'IFN γ peut induire des pathologies auto-immunes et inflammatoires. Pour cette raison la durée de la signalisation est finement régulée par différents mécanismes.

D'une part, l'activation de STAT1 est inhibée environ une heure après le stimulus par l'IFN γ et ce malgré la présence continue de l'IFN γ , par l'internalisation du complexe IFN γ :IFN γ R α après signalisation. Ce complexe est ensuite dissocié, l'IFN γ dégradé et le récepteur déphosphorylé, puis l'IFN γ R α retourne à la surface et l'IFN γ R β se dégrade. Il se peut parfois que l'IFN γ R α soit également dégradé [52, 61].

D'autre part, l'IFN γ induit l'expression de SOCS (suppressor of cytokine signalling), un inhibiteur spécifique et rétroactif. SOCS-1 est le plus réactif dans le cas de l'inhibition de l'IFN γ . Il inhibe la signalisation de l'IFN γ en liant JAK1 et JAK2. En plus, il induit la dégradation des molécules impliquées dans la signalisation par leur association avec l'ubiquitine [52, 62].

Enfin la dephosphorylation des JAK1, JAK2 et STAT1 par des PTP (protein tyrosine phosphate) arrête la signalisation.

1.5.d. La localisation nucléaire de l'IFN γ

L'IFN γ s'internalise après l'interaction avec son récepteur. Autrefois, cette internalisation était uniquement considérée comme correspondant à la désensibilisation et au recyclage du récepteur, mais il a été démontré que l'IFN γ peut se retrouver dans le noyau et non pas que dans les lysosomes. En effet, l'IFN γ et l'IFN γ R α sont internalisés par l'endocytose *via* les vésicules à clathrine, connus pour la dégradation des protéines endocytées. Mais, l'IFN γ est également redirigé vers des compartiments cellulaires spécifiques par la voie des cavéoles [63].

L'IFN γ est en effet retrouvé dans le noyau. Ce transport vers le noyau nécessite un transport actif à travers un pore nucléaire à l'aide des importines liant les protéines transportées grâce à leurs NLS. Dans l'IFN γ , deux NLS ont été identifiées : les résidus 78-92 et les résidus 126-132 [64-67]. Les résidus 126-132 semblent être les plus importants, car la perte de cette séquence diminue de 90 % la localisation nucléaire de l'IFN γ [67]. Des expériences d'immunoprécipitation, démontrent l'importance de l'importine IMP α 5 dans le transport de l'IFN γ vers le noyau [66, 68]. De plus, ces expériences ont démontré une colocalisation de l'IFN γ avec l'IFN γ R α et avec STAT1 dans le noyau où il semble que c'est l'IFN γ qui transloque le STAT1 et l'IFN γ R α vers le noyau. L'IFN γ R β , en revanche, n'est pas transloqué vers le noyau et la majorité reste par conséquent sur la surface cellulaire [69].

Ces expériences mettent en question la cascade de signalisation JAK-STAT postulée auparavant où l'IFN γ interagit avec son récepteur qui à son tour active STAT1. En effet, une interaction directe entre l'IFN γ , un domaine intracytoplasmique de l'IFN γ R α et STAT1 a été démontrée [70-71]. Ces interactions semblent nécessaires pour activer et transloquer STAT1 vers le noyau et déclencher l'expression des gènes contenant les GAS [54, 72-73]. Récemment, il a été démontré que STAT1 possède également des séquences NLS (auparavant non identifiées car non conventionnelles) et que l'interaction avec l'IFN γ ou l'IFN γ R α n'est pas indispensable pour la localisation de STAT1 dans le noyau [74]. Il en est de même pour l'IFN γ R α sur lequel des séquences NLS ont été découvertes [75]. Une hypothèse peut être que le taux et l'identité des gènes activés par STAT1 diffèrent par l'interaction de STAT1 avec l'IFN γ et/ou avec l'IFN γ R α mais aucune preuve scientifique n'a été apportée à ce jour.

L.6. Le domaine C-terminal de l'interféron gamma

Le domaine C-terminal de l'IFN γ débute à l'alanine 125 et est une région contenant deux domaines basiques : le domaine D1, du résidu 125 au résidu 131 contenant trois résidus de lysine et deux résidus d'arginine et le domaine D2 du résidu 137 au résidu 142 contenant trois résidus d'arginine (figure 11).

Cette région non structurée de la cytokine est très sensible à la protéolyse et différentes formes sont retrouvées : la forme complète et celles issues de diverses protéolyses partielles [76]. Comme présentées sur la figure 11, les formes dépourvues de quelques AA - perte du domaine D2 -, ont une activité biologique accrue. Par contre, la perte d'AA supplémentaires, issus du domaine D1, entraînent la perte totale de l'activité de l'IFN γ . Ces changements d'activité ne sont pas dus au changement de la structure du corps protéique car il reste invariable malgré la perte des AA du peptide C-terminal de l'IFN γ , mais semble être dus à la diminution de l'affinité pour le récepteur. Cependant aucune étude n'a démontré ce point de façon rigoureuse [46, 77-80].

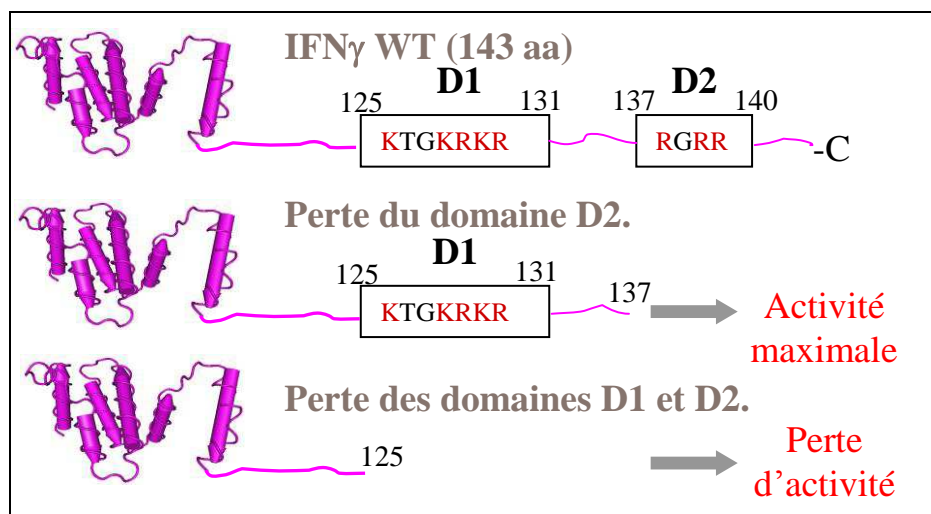


Figure 11 : Schéma du domaine C-terminal de l'IFN γ .

La région C-terminale de l'IFN γ (125 – 143) contient deux domaines riches en AA basiques : le domaine D1 (125-131) et le domaine D2 (137-140). Ces domaines jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de l'IFN γ . Ils sont également identifiés en tant que NLS et comme site possible d'interaction avec le récepteur.

En l'absence du domaine C-terminal de l'IFN γ dans les structures cristallographiques du complexe IFN γ :IFN γ R, une interaction éventuelle entre l'IFN γ R et le peptide C-terminal de l'IFN γ ne peut être directement visualisée. En revanche, grâce à des études avec des peptides synthétiques, des anticorps monoclonaux (AcM, AcM 293-4-45 pour le domaine D1 et AcM 13-16-2 et 293-4-45 pour le domaine D2), et des digestions limitées, l'implication du domaine C-terminal dans l'interaction avec le récepteur a été fortement suggérée [80-84]. Cette

interaction semble suffisante pour déclencher certaines voies de signalisation activées par l'IFN γ [71, 85-86]. L'interaction du domaine C-terminal de l'IFN γ avec l'IFN γ R se situerait principalement dans le domaine D1. Ceci a été démontré par le fait que ce domaine n'est plus accessible aux AcM après liaison avec l'IFN γ R contrairement au domaine D2. De plus, l'absence du domaine D1 diminue fortement l'association de ce complexe. Étonnement, l'absence du domaine D2 augmente la vitesse d'association par un mécanisme qui reste non compris à ce jour. Par contre, l'absence du domaine C-terminal ne modifie pas la dissociation du complexe IFN γ :IFN γ R [80]. Cette partie est également fortement conservée entre les différentes espèces comme illustré sur la figure 12.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, cette partie de l'IFN γ contient des séquences NLS permettant le transport de l'IFN γ (éventuellement en complexe avec son récepteur ou avec STAT1 ou seul) vers le noyau. Cette séquence C-terminale de l'IFN γ est également le site d'interaction avec les héparanes sulfates (HS) [87]. Cette interaction et ses conséquences seront largement illustrées dans le paragraphe III.5.

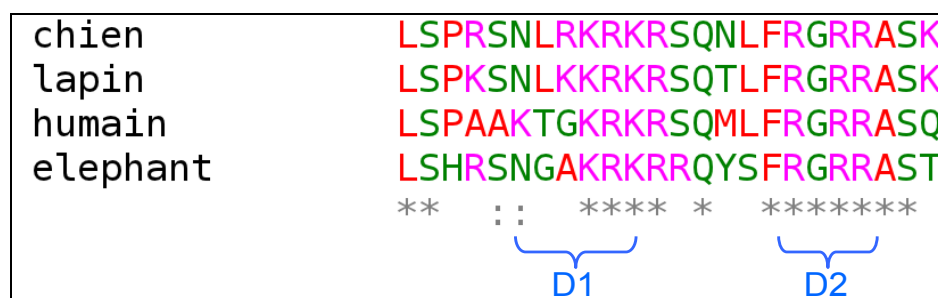


Figure 12 : Alignement des séquences C-terminales de l'IFN γ .

L'alignement des séquences de différents orthologues de l'IFN γ démontre une forte conservation des résidus basiques présents dans le domaine C-terminal de l'IFN γ . Cette forte conservation suggère un rôle essentiel pour ces résidus. « * » indique les résidus strictement conservés et « : » indique des substitutions conservées. Les résidus en rouge sont hydrophobes, en rose basiques et en vert polaires.

I.7. Rôles biologiques de l'IFN γ

I.7.a. Les rôles observés in vitro

Le nombre de gènes connus pour lequel l'IFN γ régule l'expression a augmenté de façon considérable : en 1990 Staeheli *et al.* citaient uniquement 20 gènes, alors qu'en 1997 Boehm *et al.* [88] en listaient déjà plus de 200. Une base de données de gènes régulés par les interférons, de type I, II et III confondu, a été créée en 2009 [89]. Chez l'homme, déjà 2000 gènes sont identifiés pour être régulés par les interférons.

L'IFN γ était à l'origine défini comme un agent antiviral, mais possède bien d'autres fonctions comme des effets antibactériens, des effets sur la différenciation, l'apoptose et la prolifération

ou encore la stimulation de la présentation des antigènes. Cependant, la liste de protéines régulées par IFN γ contient certaines protéines pour lesquelles les fonctions biologiques en réponse à l'IFN γ restent encore obscures. Malgré le nombre important de gènes régulés par l'IFN γ , nous pouvons les classer par leurs mécanismes d'actions.

- **L'action immunomodulatrice de l'IFN γ**

Les cellules CD4⁺ sont des intermédiaires du système immunitaire. Elles sont activées par certains antigènes issus des pathogènes. Selon la source de l'activation et la présence d'autres cytokines elles se différencient en cellules CD4⁺ Th1 ou en cellules CD4⁺ Th2. En effet, la présence d'IFN γ (et d'IL12) induit la différenciation en cellules CD4⁺ Th1 contrairement à l'IL4 qui permet la différenciation en cellules CD4⁺ Th2. L'IFN γ n'est pas l'inducteur primaire de cette différenciation mais il permet de stabiliser de façon directe ou indirecte (par l'expression de l'IL12) la différenciation en cellules CD4⁺ Th1. L'IFN γ dirige donc le système immunitaire vers une réponse de type Th1 : activant plus les cellules T que B, induisant une immunité cellulaire, augmentant l'efficacité des macrophages, aidant à la prolifération des cellules CD8⁺ et promouvant la production des opsonines [88, 90].

D'autre part, l'IFN γ régule la commutation des classes d'anticorps (immunoglobulines ou Ig) exprimés par les cellules B. Elle favorise la sécrétion des IgG2a et minoritairement des IgG3 [88, 91].

- **L'augmentation de la présentation des antigènes**

Les MHC de classe I sont ubiquitairement exprimés par la plupart des cellules. Par contre, l'IFN γ accroît leur expression. Les MHC de classe I présentent à la surface cellulaire des peptides issus des protéines cytosoliques et sont reconnus par les cellules CD8⁺. Ces peptides peuvent être dérivés des pathogènes envahissant l'hôte [88, 92].

Les MHC de classe II ne sont pas ubiquitairement exprimés par les cellules sauf par les cellules dendritiques et les cellules B. Leur expression est induite ou exaltée par l'IFN γ . Les MHC de classe II présentent des peptides internalisés par endocytose c'est à dire des peptides issus des protéines extracellulaires comme ceux des pathogènes extracellulaires. Ces peptides sont reconnus par les cellules CD4⁺ qui déclenchent une réponse immunitaire appropriée [88, 93].

L'IFN γ augmente la présentation des MHC de classe I et II par l'expression de protéases, de transporteurs de peptides ou encore de chaperonnes impliquées dans le repliement et stabilisation des MHC de classe I et II [52].

D'autres récepteurs membranaires, impliqués dans la réponse immunitaire, sont en général également exprimés grâce au stimulus par l'IFN γ . On peut noter l'expression du Fc γ récepteur

I, de l'ICAM (intercellular adhesion molecules)-1, du B7 antigène *etc.* L'action de certains d'entre eux sera précisée dans d'autres paragraphes. Il est à noter que certaines exceptions existent, comme l'inhibition de l'expression de CD1A, CD80, CD4, E- et P-selectine. Elles sont partiellement à la base de l'effet immunosuppresseur de l'IFN γ [24].

- **La production des dérivés réactifs d'oxygène et d'azote**

L'IFN γ est un des principaux facteurs d'activation des macrophages par l'augmentation du métabolisme de l'oxygène. En effet, l'IFN γ augmente la présence de la forme active de la NADPH oxydase, enzyme nécessaire à la production des dérivés réactifs d'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'anion superoxyde (O₂⁻). Ainsi, les macrophages produisent et sécrètent une quantité supérieure de ROS, augmentant ainsi leur capacité à tuer les pathogènes [52, 88, 94-95].

Un autre composant important dans la capacité des macrophages à tuer les pathogènes est l'oxyde nitrique (NO), connu comme étant un antimicrobien puissant. Le NO est produit par l'enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase) à partir de la L-arginine et du BH₄. L'IFN γ augmente la production de NO par l'expression de l'iNOS et par l'augmentation des enzymes essentielles à la production de L-argine et de BH₄ telle que l'argininosuccinate-synthetase et la GTP-cyclohydroxylase I [88, 96].

Il est donc évident que l'IFN γ augmente la capacité cytotoxique des macrophages par l'induction de la production des réactifs d'oxygène et d'azote.

- **Les effets antiviraux**

L'activité antivirale, activité par laquelle l'IFN γ fût découvert, est 10 à 100 fois moindre que celle observée pour l'IFN α ou l'IFN β . Elle provient majoritairement de l'expression de 3 protéines antivirales; (1) la PKR (double-stranded RNA activated protein kinase) : protéine inhibant la synthèse protéique virale, (2) la 2-5A synthétase (2'-5' oligoadenylate synthétase) : enzyme nécessaire pour la dégradation de l'ARNss (acide ribonucléique à un brin) par la riboendonucléase RNaseL, (3) et la dsRAD (dsRNA specific adenosine deaminase) : enzyme catalysant la déamination de l'ARNds (ARN à double brin). De plus, les effets pro-apoptotiques et l'inhibition du cycle cellulaire limitent la réplication virale [52, 88, 97].

- Les effets sur le cycle cellulaire et l'apoptose

Les macrophages peuvent acquérir des fonctions spécifiques antimicrobiennes mais également entrer en apoptose. L'IFN γ , connu pour l'activation des macrophages, peut induire ces effets mais l'équilibre entre l'acquisition des fonctions antimicrobiennes et l'induction de l'apoptose reste encore mal connu.

L'apoptose est l'induction du suicide cellulaire utile en cas d'invasion par des pathogènes, mais non désirée en cas d'induction par les pathogènes eux-mêmes. En dépit de la méconnaissance de l'action de l'IFN γ sur l'apoptose, le rôle du « interferon regulatory factor-1 » (IRF-1) semble primordial dans ce processus. En présence de grandes quantités d'IFN γ R, on assiste à une importante production d'IRF-1 induisant l'apoptose. Au contraire, une expression plus faible d'IFN γ R induit une quantité moindre d'IRF-1 empêchant l'apoptose. L'IRF-1 induit l'expression de molécules pro-apoptiques, cependant l'IFN γ peut aussi directement induire certaines de ces molécules comme PKR, DAP, cathepsin D etc. [48, 73].

Si les macrophages, ou de façon plus générale les phagocytes, ne sont pas envahis par des pathogènes, l'IFN γ induit préférentiellement leur activation et non leur apoptose. Plusieurs mécanismes existent pour augmenter leurs effets antimicrobiens. Tout d'abord, comme décrit auparavant, grâce à l'induction de molécules réactives d'oxygène ou d'azote. Ensuite, l'augmentation d'expression de Fc γ récepteur I ou de ICAM-1 induit le recrutement des leucocytes et active leur cytotoxicité (ceci sera décrit plus en détails dans le paragraphe ci-dessous). D'autre part, l'IFN γ augmente l'expression des enzymes essentielles pour le catabolisme du tryptophane provoquant son épuisement. Ceci a un effet anti-parasitique [52, 88, 98]. Enfin, l'effet antimicrobien des macrophages peut être activé par l'interaction des récepteurs de type toll (TLR) avec les lipopolysaccharides (LPS), des bactéries gram négatif. L'IFN γ sensibilise les macrophages aux LPS par l'augmentation d'expression des TLR, de molécules auxiliaires à l'interaction du TLR avec les LPS ou de molécules de cascades de signalisation du TLR [73, 88, 99].

Comme les IFN de type I, l'IFN γ bloque le cycle cellulaire, le plus souvent entre la phase G1 et S. Ceci par l'expression de protéines inhibant la transition vers la phase S. On pourra citer comme exemple l'induction de p21 ou p27 CKI bloquant la cycline E:CDK2 et la cycline D:CDK4, enzymes essentielles pour la transition vers la phase S. L'IFN γ inhibe également l'expression de c-myc tout en activant l'expression de mad-1, le rapport entre mad1 et c-myc contrôle la prolifération ou l'arrêt cellulaire. Le blocage du cycle cellulaire dans des macrophages les rend insensibles à l'apoptose induit par les pathogènes [73, 100].

- **La régulation de la migration des leucocytes**

Les leucocytes circulent librement, mais en cas d'infection, d'inflammation ou de blessure, ils doivent être dirigés vers le site concerné avant de s'infiltrer entre les cellules endothéliales par diapédèse. Le rôle de l'IFN γ lors de la diapédèse est complexe et a lieu tout au long des différentes étapes. Premièrement, certaines chimiokines, induites par l'IFN γ comme IP-10, forment des gradients favorisant le roulement (ou « rolling ») et l'activation des leucocytes vers le site en question. Ensuite, l'attachement des leucocytes sur les cellules endothéliales est favorisé par l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1, induite par l'IFN γ , sur les cellules endothéliales liant les intégrines présentes sur les leucocytes. Cette interaction entre les cellules endothéliales et les leucocytes entraîne la diapédèse proprement dite [24, 52, 88, 101].

I.7.b. Répercussions de l'IFN γ *in vivo*

Grâce à l'obtention d'IFN γ pur et l'utilisation d'AcM neutralisants, dans les années 80, les premiers travaux ont pu indiquer les rôles de l'IFN γ *in vivo*. Depuis 1993, une analyse plus précise est possible à l'aide des souris mutantes déficientes pour l'expression de l'IFN γ ou de son récepteur. De nos jours, l'importance de l'IFN γ dans de nombreux processus biologiques est considérablement illustrée [24]

Dans la suite de ce manuscrit, l'implication de l'IFN γ dans la défense contre les infections, les maladies auto-immunes et le cancer sera détaillée.

- **La défense contre les infections**

Les cellules doivent rapidement et adéquatement répondre aux attaques de divers pathogènes (virus, bactérie, parasite, champignon...). L'IFN γ est depuis les années 80 identifié comme un intermédiaire important dans la réponse contre ces infections.

Dans l'infection par des bactéries comme *Listeria*, l'IFN γ augmente ou rétablit la résistance, par l'activation des macrophages. En administrant des anticorps neutralisant dirigés contre l'IFN γ cet effet protecteur est totalement détruit [102-104]. Cette activation des macrophages est également importante dans les infections par *Salmonella* [105].

Le rôle de l'IFN γ est bien établi dans les mycobactérioses, maladies majoritairement retrouvées chez des patients immunodéprimés. Chez l'homme, trois mycobactéries existent : *Mycobacterium leprae*, *bovis* et *tuberculosis*. L'administration sous-cutanée d'IFN γ augmente l'infiltration des leucocytes et diminue la présence de *M.leprae* [106]. L'absence d'IFN γ chez

les souris les rend incapables de résister aux doses non létales de *M. tuberculosis* ou *M. bovis* [107-108].

Nombreuses sont les infections virales pour lesquelles le rôle de l'IFN γ a été démontré comme pour le cytomégalovirus, l'herpès ou encore la dengue [109-111]. L'IFN γ peut agir par l'expression de molécules antivirales mais également par une activité immunomodulatrice ou par l'activation des cellules NK ou des macrophages [24].

- **Les maladies auto-immunes**

Historiquement, l'IFN γ est considéré comme un facteur pro-inflammatoire et la perturbation de son expression est depuis longtemps associée aux maladies auto-immunes [112]. Ces maladies sont caractérisées par le développement de l'immunité contre des antigènes du soi entraînant une inflammation chronique. En effet, l'administration d'AcM dirigés contre l'IFN γ , dans divers modèles animaux de maladies auto-immunes - comme la thyroïdite auto-immune expérimentale, le diabète de type I ou la névrite allergique - diminue la durée de la maladie et après traitement il réduit les risques de réémission [113].

Il apparaît néanmoins que l'implication de l'IFN γ dans ces maladies est plus ambiguë. En effet, l'IFN γ a des propriétés autant anti- que pro-inflammatoires, comme montré en figure 13. Le rôle protecteur de l'IFN γ au cours de ces maladies proviendrait de la suppression ou de la diminution de la réponse Th17, sous-classe des cellules T particulièrement associées aux maladies auto-immunes. Le rôle pathogénique, quant à lui, proviendrait de l'activation de macrophages et de l'augmentation de l'inflammation par le recrutement des cellules immunitaires.

Ce rôle complexe de l'IFN γ nécessite une compréhension détaillée avant de pouvoir utiliser, soit de l'IFN γ soit des anticorps contre l'IFN γ , comme thérapie modifiant l'équilibre entre la réponse Th1 et Th17 [113-115].

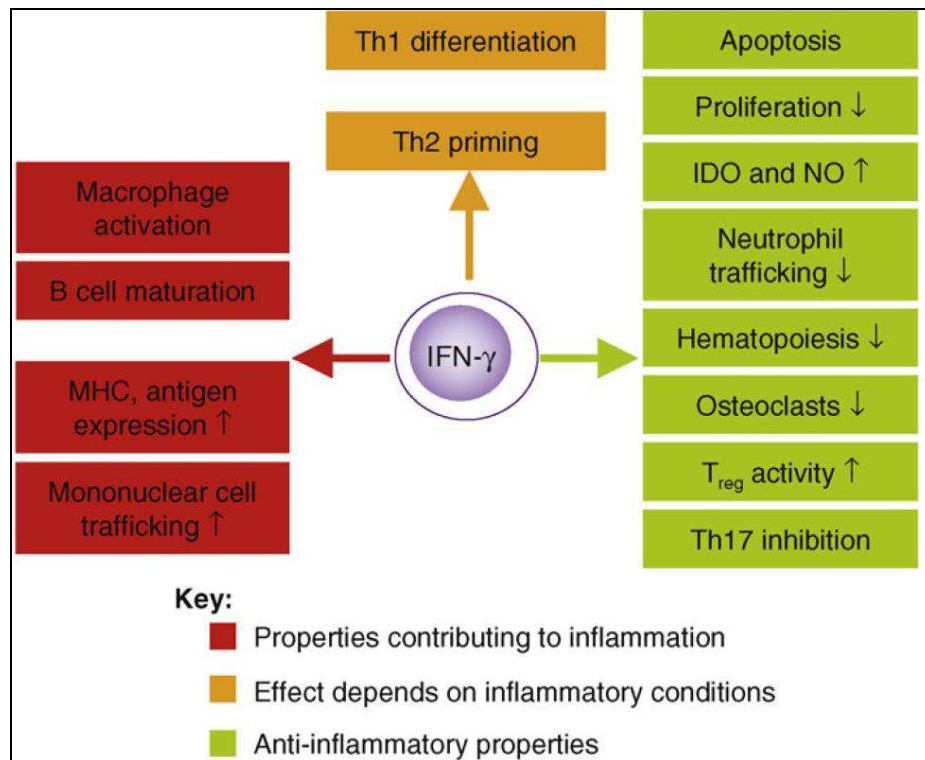


Figure 13 : Schéma représentant les actions pro- et anti-inflammatoires de l'IFN γ .
D'après Kelchtermans *et al.*, 2008 [114].

• Le cancer

Le rôle de l'IFN γ dans le développement de tumeurs n'a été élucidé que récemment. Des expériences utilisant de l'IFN γ R soluble ou des AcM dirigés contre l'IFN γ ont démontré son implication dans le rejet de tumeurs et il limiterait la croissance tumorale [116]. Son mécanisme d'action est de mieux en mieux compris et semble être initié par des cellules NK et NKT qui reconnaissent des signaux sur la surface des tumeurs et expriment par la suite l'IFN γ . Ceci provoque l'expression des chimiokines comme IP-10, Mig et I-TAC, facteurs connus comme inhibiteurs de l'angiogenèse. En empêchant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, la croissance tumorale est limitée. D'autre part, ces chimiokines forment des gradients chimiotactiques attirant des leukocytes qui, une fois arrivés au site tumoral, expriment à leur tour de l'IFN γ . Cette deuxième vague d'IFN γ active les macrophages et les cellules NK, augmentant la production des cytokines immunomodulatrices comme l'IL12 et l'IL18. Ceci entraîne la réponse immunitaire adaptative activant les cellules CD8 $^{+}$ et les cellules CD4 $^{+}$ Th1.

Depuis 2001, il a été proposé que l'IFN γ ne soit pas uniquement doté d'une fonction protectrice mais il modulerait également la réponse immunitaire en sculptant le phénotype immunogène des tumeurs [117]. En effet, il a été démontré qu'en présence d'IFN γ les

tumeurs deviennent moins susceptibles d'être reconnues par les cellules immunes, ceci est contradictoire avec l'idée que l'IFN γ protège les cellules contre le cancer [118-119].

I.8. Utilisation thérapeutique d'IFN γ ou d'anticorps monoclonaux contre l'IFN γ

I.8.a. Injection de l'IFN γ

L'actimmune IFN γ 1b est un analogue de l'IFN γ . C'est cet analogue de l'IFN γ qui est majoritairement employé dans des études cliniques ou pour soigner certaines maladies comme spécifié ci-dessous. Il diffère de l'IFN γ naturel par le fait qu'il est non-glycosylé, que le domaine C-terminal comporte une pyroglutamate bloqué et qu'il contient 140 AA au lieu de 143 AA. Ses effets secondaires comportent surtout des états grippaux : fièvre, maux de tête, frissons, myalgie et fatigue [120].

Depuis 1991, l'IFN γ 1b est approuvé par l'Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour le traitement de la granulomatose septique chronique. Cette maladie héréditaire est due au mauvais fonctionnement des leucocytes incapables de produire des dérivés oxygénés, actifs antimicrobiens. Les patients sont donc perpétuellement menacés par des infections bactériennes et fongiques. L'administration de l'IFN γ 1b diminue la fréquence et la gravité des infections [120-123]

La deuxième maladie, pour lequel l'administration de l'IFN γ 1b est approuvée par la FDA, est l'ostéopétrose, maladie osseuse congénitale rare, causé par un mauvais fonctionnement des ostéoclastes. Dans la forme sévère maligne, la maladie empêche la résorption osseuse et entraîne une densification généralisée du squelette pouvant être mortelle à long terme. L'administration de l'IFN γ 1b augmente la résorption des os spongieux et libère de l'espace au centre des os pour la moelle osseuse. Elle retarde ainsi la progression de la maladie [121, 124-125].

Concernant le cancer, plusieurs études sont en cours, le plus souvent en complément de la chimiothérapie. Malgré l'inhibition de la croissance tumorale et l'induction de l'apoptose des cellules tumorales, une étude clinique en phase III a été arrêtée subitement du fait d'un taux de survie moins important lorsque l'IFN γ 1b était administré en complément de la thérapie traditionnelle. Cependant, au Japon, l'administration de l'IFN γ a déjà été approuvée dans le cas de la leucémie des cellules T chez l'adulte [121, 126].

La tuberculose atteint le système respiratoire par l'infection du *Mycobacterium tuberculosis*. L'émergence de souches multi-résistantes nécessite de nouveaux agents thérapeutiques.

L'administration de l'IFN γ , seul ou en complément de la thérapie conventionnelle, a été testée dans un essai clinique et semble diminuer considérablement la maladie lorsqu'il est administré par aérosol ou injecté en intramusculaire [121, 127-128].

Une autre manière d'apporter de l'IFN γ est l'utilisation de vecteurs issus d'adénovirus que l'on a préalablement rendu incapable de se répliquer. Lors d'essais cliniques en phase I, l'IFN γ , apporté de cette façon, s'est avéré très prometteur pour les lymphomes cutanés primaires. Une phase II est actuellement en cours [129]. En revanche, dans les mélanomes malins, seuls des effets partiels ont pu être observés par l'apport de l'IFN γ par l'utilisation des vecteurs issus d'adénovirus [130].

I.8.b. Inhibition de l'IFN γ

Dans d'autres maladies, contrairement à celles présentées ci-dessus, l'action de l'IFN γ accroît la maladie et son activité est donc à bannir. L'utilisation d'anticorps anti-IFN γ peut alors être envisagée. Deux anticorps anti-IFN γ sont disponibles, Fontolizumab (HuZAF) - un anti-IFN γ humanisé - et AMG811 - un anti-IFN γ humain monoclonal – aucun n'ayant été approuvé par la FDA. Les effets secondaires sont modérés et rares, ils incluent des maux de tête, des vomissements, des maux de ventre, des nausées, des douleurs articulaires, des toux et de l'asthénie [131-132]. Ces anticorps sont le plus souvent utilisés dans des essais cliniques contre des maladies auto-immunes.

Dans la maladie de Crohn, maladie provoquant l'inflammation chronique de l'intestin, un essai clinique en phase II avec HuZAF ne démontre pas d'effet important. Cependant l'expression de certaines protéines impliquées dans la maladie diminue fortement laissant entrevoir un possible effet biologique [132].

Dans la sclérose en plaques, maladie neurologique auto-immune chronique du système nerveux central, un traitement par administration d'IFN β semble inhiber l'activation du système immunitaire par le biais de l'IFN γ . L'administration d'anticorps anti-IFN γ pourra par conséquent représenter un nouveau traitement thérapeutique. En effet des études préliminaires démontrent un retard de la progression de la maladie par l'administration d'AcM anti-IFN γ [131].

Enfin, dans la polyarthrite rhumatoïde, maladie dégénérative inflammatoire chronique, après un premier essai sans différences significatives, des résultats récents démontrent un effet bénéfique en administrant l'AcM anti-IFN γ .

Enfin, Amgen[®] a lancé un essai clinique en phase Ib utilisant leur AMG811, AcM anti-IFN γ humain pour le lupus érythémateux disséminé. Ceci est une maladie auto-immune générale chronique touchant les tissus conjonctifs. Il a été démontré que l'IFN γ a une action néfaste sur la maladie. [121, 133].

II. Les héparanes sulfates

II.1. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont des glycoprotéines constituées d'un corps protéique sur lequel une ou plusieurs chaînes de carbohydrates de type glycosaminoglycane (GAG) sont greffées. Ces glycoprotéines sont présentes dans la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que dans le glycocalyx de la plupart des cellules de mammifères (figure 14). Les PG peuvent être classés soit en fonction du corps protéique soit en fonction de la nature des chaînes GAG qu'elles portent ou encore en fonction de leur localisation. Parmi ces glycosaminoglycanes, on trouve les héparanes sulfates (HS), l'héparine (Hp), les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates (DS), l'acide hyaluronique (HA) et les kératanes sulfates (KS).

Les fonctions biologiques d'un PG peuvent être exercées à la fois par le corps protéique et par les GAG. Cependant, la localisation dépend majoritairement de la partie polypeptidique et donc du corps protéique. Dans la suite de cette introduction, les corps protéiques des PG ne seront que succinctement illustrés car durant ma thèse je me suis intéressée à l'interaction des chaînes GAG des PG avec l'interféron gamma.

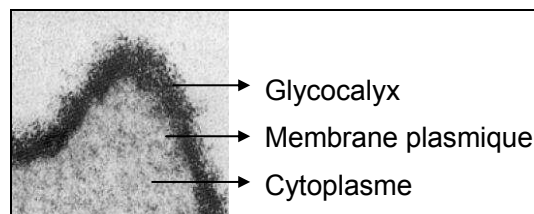


Figure 14 : Le glycocalyx.

Image en microscopie électronique d'un lymphocyte coloré par du rouge de « ruthenium ». d'après Albert *et al.*, 2002 [134]

II.2. Les corps protéiques

Quatre grands groupes de PG existent et sont organisés selon leur localisation : les PG membranaires, les PG matriciels, les PG intracellulaires et les PG circulants. Les PG membranaires seront illustrés plus en détail par la suite car ce sont ces PG, présents sur la surface cellulaire, qui portent la majorité des chaînes d'HS, car les recherches effectuées au cours de ma thèse ont porté sur ce type de PG. Cependant un aperçu global des différents PG cités précédemment sera tout de même donné.

II.2.a. Les protéoglycanes membranaires

• Syndécanes

Les syndécanes sont des protéines transmembranaires de type 1, composées d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale, d'un domaine extracellulaire portant 3 à 5 chaînes d'HS et parfois (pour les syndécanes 1 et 3) des chaînes de CS, d'un domaine transmembranaire hydrophobe conservé ainsi que d'une courte région C-terminale intracytoplasmique [135-138] (figure 15). Les syndécanes sont tous très sensibles aux diverses protéases qui permettent le relargage sous forme soluble leur domaine extracellulaire [139]. Les ectodomaines, comprenant les parties protéiques ainsi que les parties GAG, sont susceptibles d'interagir avec de nombreuses molécules présentes dans le milieu extracellulaire influençant par exemple leur localisation ou leur signalisation.

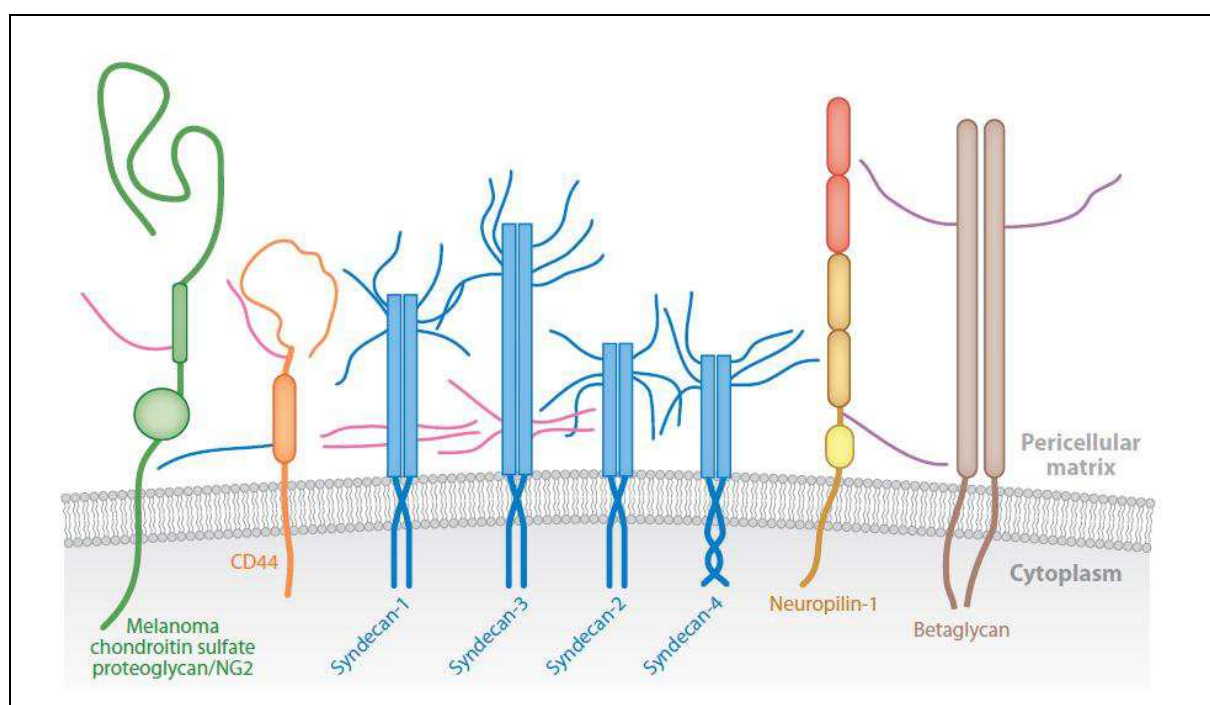


Figure 15 : Les protéoglycanes transmembranaires.

Quatre syndécanes (illustré en bleu) sont des PG portant toujours des HS sur leur extrémité N-terminale (chaînes illustrées en bleu). Parfois en plus de ce site d'attachement des GAG, un deuxième site est retrouvé plus proche de la membrane plasmique chez les syndécanes 1 et 3, souvent occupé par des chaînes de type CS (chaînes illustrées en rose). NG2 (illustré en vert) est également un PG portant toujours et uniquement des CS. Les autres PG : CD44 (illustré en orange) Neuropiline-1 (illustré en jaune et rouge) puis le bêtaglycane (illustré en marron) sont des PG portant parfois des CS, des HS ou des DS (chaînes illustrées en violet).

D'après Couchman *et al.*, 2010 [135].

Les syndécanes sont présents sur la surface cellulaire où ils jouent un rôle dans l'adhésion, la migration, l'organisation du cytosquelette et la différenciation [140-142]. Cependant, toutes leurs fonctions biologiques n'ont certainement pas encore été découvertes.

Quatre syndécanes ont été conservés durant l'évolution chez les vertébrés dont trois avec une distribution tissulaire spécifique particulière [143]. Le syndécane-1 est présent dans la plupart des épithéliums, dans le mésenchyme durant le développement mais également sur certains leucocytes. Le syndécane-2 est majoritairement présent dans le mésenchyme et dans le tissu neural en développement. Le syndécane-3, quant à lui, se trouve dans le tissu neural et dans le tissu musculaire en développement. Pour finir, le syndécane-4, est distribué de façon ubiquitaire sur la majorité des cellules. Il est donc évident que certaines cellules peuvent porter plusieurs syndécanes.

- **Glypicanes**

Le deuxième grand groupe de PG membranaires sont les glypicanes ou glycosylphosphatidylinositol (GPI)–anchored PG (figure 16). La plus grande différence avec les syndécanes est le fait qu'ils ne sont pas transmembranaires mais attachés à la membrane plasmique par un ancrage de type GPI. Ces PG portent uniquement des HS (sauf Glypicane-5 qui peut porter des CS/DS) [144].

Six glypicanes, nommés glypicane 1-6, existent chez les vertébrés. Les glypicanes ont une structure tridimensionnelle similaire du fait de 14 résidus de cystéine très conservés. La structure du glypicane-1 humain n'a que très récemment été élucidée [145]. Il contient un domaine globulaire contenant majoritairement des hélices α et les 14 résidus de cystéine conservés puis un domaine portant les chaînes d'HS probablement sans structure définie (figure 17). Ceci nous indique que les GAG se trouvent à proximité de la membrane plasmique, c'est à dire à l'opposé de ceux présents chez les syndécanes qui se trouvent éloignés de la membrane [146].

Les glypicanes sont exprimés en grande quantité lors du développement embryonnaire, mais restent exprimés, en plus faible quantité, au stade adulte, avec une expression tissulaire spécifique. Glypicane-1 est par exemple exprimé pendant le développement, dans le cerveau, les reins etc. [147].

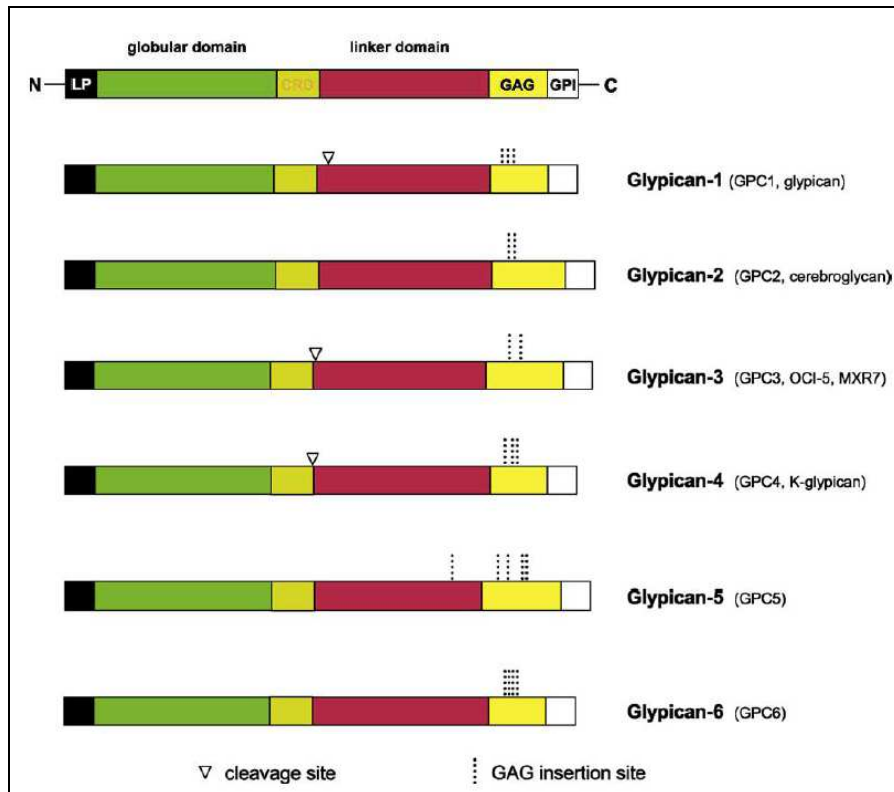


Figure 16 : Alignement de séquence des différents glypicanes.

Les glypicanes contiennent un peptide signal à l'extrémité N-terminale, en partie vraisemblablement globulaire maintenue par des ponts disulfures, un domaine de transition, puis un domaine proche du domaine C-terminal où sont attachés les HS. Les glypicanes sont attachés à la membrane plasmique par un ancrage de type GPI.

D'après Song *et al.*, 2002 [148].

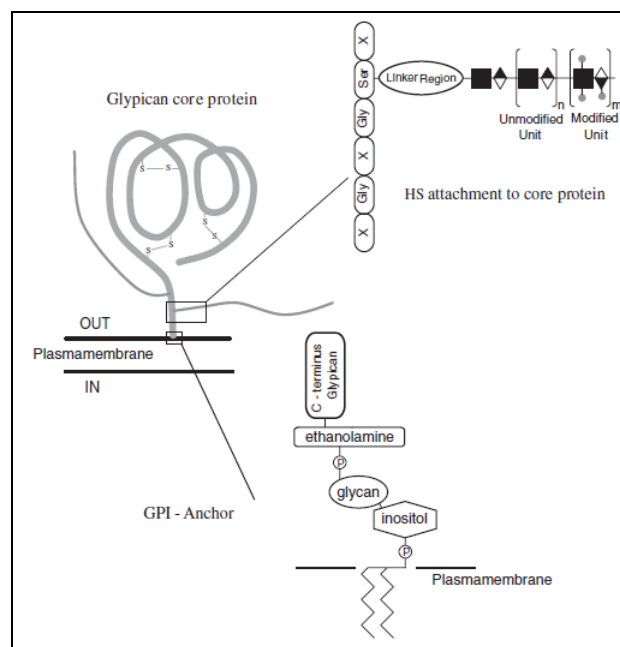


Figure 17 : Présentation de la structure des glypicanes.

Les glypicanes contiennent uniquement un domaine extracellulaire, globulaire grâce au 14 résidus de cystéine formant des ponts disulfures. Les chaînes d'HS sont attachées par ces résidus de sérine, à proximité de la membrane. L'attachement à la membrane se fait par un ancrage de type GPI.

D'après Da Cat *et al.*, 2001 [149].

- **NG2, neuropiline-1, bétaglycane et CD44**

NG2 également appelé melanoma chondroitin sulfate proteoglycane chez l'homme, est un grand PG portant uniquement une chaîne de CS [135, 150]). Il a des homologues chez tous les vertébrés mais également chez la *drosophile* ou encore chez le *Caenorhabditis elegans*. Il est exprimé dans les péricytes et les cellules de muscles lisses vasculaires mais il est surtout connu en tant que marqueur des cellules tumorales car dans ces cellules son expression est amplifiée. Cette protéine peut donc servir comme marqueur des cellules tumorales mais également comme stratégie anti-cancéreuse *via* l'utilisation des AcM dirigés contre le NG2. Wang *et al.* [151] ont en effet démontré que ces AcM inhibent *in vitro* l'effet activateur du NG2 sur la croissance tumorale et inhibent *in vivo* la croissance tumorale et la formation des métastases [151].

Neuropiline-1 est connu pour son interaction avec le VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor R 2). Contrairement à neuropiline-2 qui ne porte aucun GAG, neuropiline-1 peut porter une chaîne de CS/DS. L'absence ou la présence des GAG modifie la signalisation des facteurs de croissance associés aux neuropilines. Dans des cellules endothéliales, neuropiline-1 augmente par exemple la signalisation du VEGF [152].

Le bétaglycane est un homodimère dont chaque monomère porte une chaîne de CS/DS. Il est aussi appelé récepteur au TGF- β (transforming growth factor) de type III car il lie certains TGF et leur récepteur de type I et II. Le bétaglycane est très important non seulement dans la signalisation des TGF mais également dans la signalisation d'autres facteurs de croissance comme le FGF (fibroblast growth factor) 2 et l'inhibin [152-153].

Enfin, le CD44, peut être présent sous trois isoformes, il a trois à cinq sites d'attachement des GAG, qui sont soit des CS soit des HS. Le CD44 augmente en général la signalisation des facteurs de croissance comme l'EGF (epidermal growth factor) ou encore l'HGF (hepatocyte growth factor) mais est surtout un récepteur connu de l'acide hyaluronique [135, 154].

Ces trois PG sont tous des corécepteurs des facteurs de croissance. Ils peuvent porter des chaînes de GAG mais sont également retrouvés en leur absence [135].

II.2.b. Les protéoglycanes matriciels

Les PG sont les composants majeurs de la MEC. La plupart des PG matriciels sont des grandes protéines avec de nombreuses chaînes de CS, HS ou encore DS. Ils interagissent avec les autres composants de la MEC afin de former le tissu conjonctif ou la membrane basale, formant ainsi une matrice pour l'adhésion et la migration cellulaire. Les protéoglycanes

matriciels peuvent être classés en trois groupes: les protéoglycanes de la membrane basale contenant des chaînes d'HS et de CS, les hyalectans contenant uniquement des chaînes de CS (sauf aggrecan qui contient également des KS) et les protéoglycanes riches en leucines (SLRP) contenant des chaînes de CS, DS ou KS [155]. Je vais uniquement présenter les PG matriciels avec des HS : le perlécane, l'agrine et les collagènes tous les trois des protéoglycanes de la membrane basale.

- **Le perlécane**

Le perlécane est un HSPG (héparanes sulfate protéoglycane) qui est sécrété dans la MEC, principalement de type membrane basale. Son corps protéique est allongé et très complexe et contient 5 domaines différents pouvant porter une à trois chaînes d'HS [156]. De ce fait, un grand nombre de protéines peut interagir avec le perlécane : l'interaction peut être dépendante ou influencée par la présence des HS sur le perlécane soit être complètement indépendante de ces HS et dépendante uniquement du corps protéique du perlécane. De nombreuses fonctions sont attribuées au perlécane : la modulation de la croissance cellulaire, la régulation de l'adhésion cellulaire, la délivrance des facteurs de croissance,...[157] Il lie également d'autres composants de la membrane basale comme les laminines et le collagène IV contribuant ainsi à la formation du réseau matriciel [158].

- **L'agrine**

L'agrine est un PG à neuf domaines contenant probablement deux chaînes de HS malgré trois sites d'attachement potentiels identifiés. Il se trouve dans la membrane basale de nombreux tissus dont le glomérule rénal jouant un rôle dans la filtration. L'agrine est également sécrété pendant le développement dans les synapses neuromusculaires où il rassemble les récepteurs de l'acétylcholine [159]. Il existe deux isoformes issues d'un épissage alternatif du gène dont un est transmembranaire et l'autre extracellulaire conduisant aux différentes fonctions de l'agrine [160].

- **Les collagènes**

Différents collagènes (IX, XII, XIV, XV, XVIII) portent des chaînes de glycosaminoglycanes comprenant des CS et/ou des HS [161]. Le collagène XVIII contient par exemple deux à trois chaînes d'HS et est exprimé ubiquitairement dans les membranes basales où il joue un rôle dans le maintien de la stabilité de la membrane basale [162-163]. Des études sur des patients avec une déficience de l'expression du collagène XVIII ont montré l'importance de ce PG dans le développement oculaire [164]. Un clivage protéolytique des domaines C-terminaux, relargue un fragment appelé endostatine connu pour ses effets anti-angiogéniques [162].

II.2.c. Les protéoglycans intracellulaires

Un seul PG intracellulaire est connu aujourd'hui, la serglycine (figure 18). Cette petite protéine peut posséder jusqu'à 15 chaînes d'Hp, d'HS ou de CS. Elle est présente dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales ainsi que dans les mastocytes. L'utilisation des souris KO (knock out) pour ce PG a démontré son importance dans la formation et le maintien de l'homéostasie des vésicules de sécrétion [165-166]. Dans les vésicules de sécrétion, de nombreuses molécules, souvent des protéases, sont complexées à la serglycine. Par conséquent, une fois relâchées dans le milieu extracellulaire, elles se retrouvent parfois en complexe avec cette dernière. Ceci conduit à différentes fonctions allant de la présentation optimale du substrat aux protéases à la facilitation du transport des protéases et à la libération de l'histamine. La serglycine peut également provoquer l'apoptose si le contenu des vésicules de sécrétion est relâché dans le cytosol libérant ainsi les complexes serglycin-protéases [167].

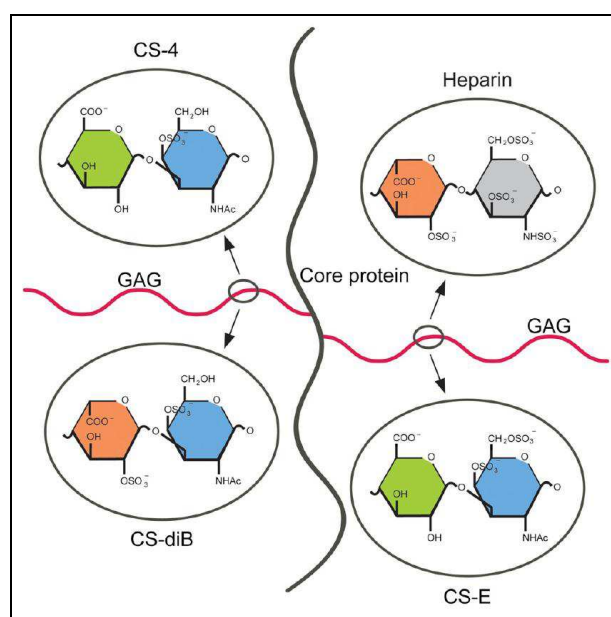


Figure 18 : Structure de la serglycine avec des chaînes de GAG.

La serglycine est un petit PG qui peut contenir jusqu'à 15 chaînes de GAG pouvant être l'Hp, HS, ou la CS.
D'après Kolset *et al.*, 2011 [167].

II.2.d. *Les protéoglycanes circulants*

Des PG peuvent parfois se retrouver circulants après le relargage de leur ectodomaine comme détaillé dans le paragraphe II.7.b. Cependant deux PG sont naturellement circulants, il s'agit de la bikunine et de l'endocane.

La bikunine est un PG contenant une unique chaîne de CS. Elle a un rôle anti-inflammatoire par l'inhibition de sérines protéases sécrétées durant des réponses inflammatoires [168]. Plus récemment, d'autres rôles ont été mis en avant : elle peut moduler la croissance cellulaire et bloquer l'influx de calcium [169].

L'endocane, antérieurement appelé endothelial cell specific molecule-1, est exprimé par les cellules endothéliales et porte uniquement une chaîne de DS. Il semble impliqué dans la régulation de nombreux processus comme l'adhésion cellulaire, l'inflammation mais également dans la progression des cellules tumorales. C'est pourquoi l'endocane peut être utilisé comme marqueur d'agressivité tumorale. Ainsi la surexpression de l'endocane est associée aux cancers sévères ayant un risque élevé de former des métastases. D'autre part, l'utilisation d'AcM dirigés contre l'endocane diminue la croissance tumorale *in vivo*, ceci peut donc représenter une approche anticancéreuse prometteuse [170].

II.3.La structure des différents GAG

Malgré le fait que les GAG soient très représentés dans la MEC, ils ont été longtemps considérés comme des molécules (appelées « mucopolysaccharides acides ») sans intérêt particulier avec pour unique fonction, la rétention d'eau. Des études plus récentes ont cependant montré leurs rôles dans des fonctions biologiques très diverses et importantes comme la croissance cellulaire, la différenciation, la morphogénèse, la migration cellulaire ou encore leur importance dans les infections bactériennes ou virales [171-174].

Ils sont apparus au cours de l'évolution chez des métazoaires étant donné qu'ils ont été retrouvés chez les vertébrés et les invertébrés, mais non chez les plantes ou les bactéries. Ces dernières synthétisent par contre des polysaccharides qui ressemblent aux GAG mais qui ne sont pas attachés à un corps protéique [175].

Ces longs polysaccharides de type GAG, pour la plupart non ramifiés (sauf pour le KS qui est un GAG apparenté), sont constitués de la répétition d'un disaccharide de base composé d'un acide hexuronique et d'une hexosamine, sauf les KS qui contiennent un galactose au lieu d'un acide hexuronique (figure 19). Chez les vertébrés, on retrouve six membres, classés en

fonction de l'identité des sucres présents dans le disaccharide de base et de leur liaison glycosidique. Ils sont regroupés en deux grandes familles, ceux avec une glucosamine en tant qu'hexosamine : les HS, l'Hp, les HA et les KS, et ceux avec une galactosamine : les CS et les DS.

En dépit du fait que cette structure de base soit relativement simple, ces différents GAG présentent une grande hétérogénéité puisqu'ils peuvent varier en longueur et subir différentes modifications (épimerisation, sulfatation) [175]. Ils sont également retrouvés dans divers tissus comme indiqués sur le tableau 3.

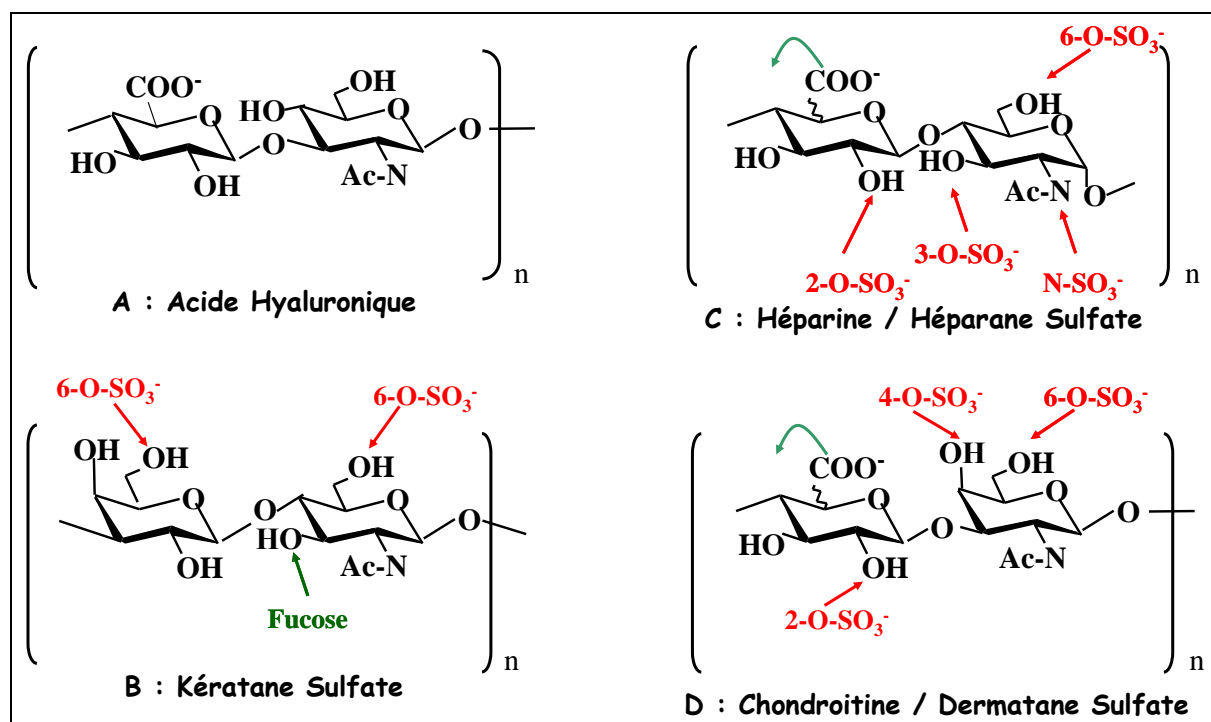


Figure 19 : La structure disaccharidique de base et les modifications possibles des GAG.

GAG	Localisation
Acide Hyaluronique	Tissus épithéliaux et conjonctifs, humeur vitrée, liquide synovial, peau
Chondroïtine Sulfate	Cartilage, os
Dermatane Sulfate	Peau, vaisseaux sanguin, valves du cœur
Keratane Sulfate	Corné, os, cartilage
Heparane Sulfate	Ubiquitaire
Héparine	Mastocytes

Tableau 3: Distribution des différents GAG dans les différents tissus.

II.3.a. *Acide hyaluronique*

L'acide hyaluronique (HA) fut découvert en 1934. Il s'agit du deuxième GAG découvert après l'héparine en 1916 [176]. Son disaccharide de base est un D-GlcA- β (1-3)-D-GlcNAc- α (1-4) ne subissant aucune modification. Il a quelques originalités pour un GAG : tout d'abord c'est le seul GAG qui ne contient aucun groupement sulfate, de plus sa biosynthèse n'a pas lieu dans l'appareil de Golgi mais dans la membrane plasmique, enfin il n'est jamais lié à un corps protéique et est sécrété dans la MEC [177]. Il a une masse moléculaire élevée, allant de 5 à 20 000 kDa et retient d'énormes quantités d'eau dans la MEC assurant ainsi son hydratation.

II.3.b. *Chondroïtine sulfate*

Les chondroïtines sulfates (CS) furent découvertes en 1954 peu après les HA [178]. Les chaînes des CS sont non-ramifiées et composées de D-GlcA- β (1-3)-D-GalNAc- β (1-4). Si l'acide glucuronique (GlcA) est épimérisée en L-acide iduronique (IdoA), on ne parle plus de chondroïtine sulfate mais de dermatane sulfate (DS), auparavant appelé CS de type B. Quatre types de CS existent, différenciés selon l'emplacement des groupements sulfates. Les CS de type A contiennent des groupements sulfates sur le C4 du GalNAc, les CS de type C sur le C6 du GalNAc. Des CS plus sulfatés et plus rares sont les CS de type D sulfatés sur le C2 du GlcA ainsi que sur C6 du GalNAc puis les CS de type E sur le C4 et C6 du GalNAc.

Les CS sont toutes liées à un corps protéique par un résidu de sérine. Les CS sont principalement retrouvées dans les tissus conjonctifs et sont connues pour conférer aux tissus qui les contiennent des propriétés élastiques et de résistance à la compression [179].

II.3.c. *Dermatane sulfate*

Comme précisé précédemment, les dermatanes sulfates (DS) étaient dans un premier temps classés comme un sous-type de CS, dit de type B avec L-IdoA- α (1-3)-D-GalNAc- β (1-4) comme disaccharide de base. Aujourd'hui, ils forment une classe à part entière puisque la présence d'acide iduronique, issu de l'épimérisation de GlcA présent dans la chaîne, leur confère des structures particulières : l'IdoA est plus flexible, de plus l'épimérisation permet l'O-sulfatation en position C-2 de l'IdoA créée. De ce fait ils ont aussi des capacités de reconnaissance des protéines différentes de celles des CS [180].

II.3.d. *Kératane sulfate*

Les kératanes sulfates (KS) furent identifiés en 1939 par Funderburgh *et al.* [181] mais caractérisés plus tard par Meyer *et al.* en 1953 [182]. Le disaccharide de base est un D-Gal- β (1-4)-D-GlcNAc- β (1-3) qui peut être sulfaté en position C6 du galactose ou de la GlcNAc [181].

Il s'agit là de GAG particuliers. En effet, le disaccharide de base n'est pas composé d'un acide hexuronique mais d'un galactose. De plus, les KS ne sont pas des chaînes linéaires : ils peuvent être branchés par des fucoses aux positions C1 ou au C3 de la glucosamine et ils peuvent posséder des acides sialiques à leur extrémité [183].

Trois classes de KS existent classées selon leur type d'attachement au corps protéique [181]. Les KS de type I sont attachés par leur GlcNAc à une asparagine présente dans le corps protéique (GlcNAc-N-Asp), les KS de type II sont attachés par leur GalNAc à un résidu de sérine ou un résidu de thréonine (GalNAc-O-Ser/Thr), puis les KS de type III sont également attachés à un résidu de sérine ou de thréonine mais par un résidu de mannose présent sur la chaîne des KS (KS-Man-O-Ser/Thr).

II.3.e. *Héparane sulfate & héparine*

L'héparine (Hp) et les héparanes sulfates (HS) sont les GAG les plus sulfatés. Leur disaccharide de répétition est un D-GlcA- β 1-4-D-GlcNAc- α (1-4), mais de nombreuses modifications ont lieu tout au long de la chaîne (voir paragraphe II.4.d), illustrées sur la figure 20.

La différence entre l'Hp et les HS est la quantité de sulfatation, l'Hp est amplement sulfatée tout au long de la chaîne contrairement aux HS qui sont moins sulfatés et dont les groupements sulfates sont concentrés dans des domaines spécifiques. En effet, les HS sont composés de domaines peu sulfatés, appelés domaines NA (pour N-acétylé), espacés de domaines amplement sulfatés, appelés domaine NS (pour N-sulfaté). Ces domaines, dont la distribution varie, sont délimités par des petites régions de transition moyennement sulfatées, ou domaines NA/NS. Les HS sont retrouvés ubiquitairement dans des cellules de mammifères contrairement à l'Hp qui se trouve uniquement dans les mastocytes [184-185].

La variabilité dans leur structure et par conséquent le rôle de cette variabilité, a fait l'objet de nombreuses études [186]. Aujourd'hui ces polysaccharides sont connus pour de très nombreuses activités biologiques et leurs applications thérapeutiques potentielles ne cessent

d'augmenter depuis la découverte d'un pentasaccharide particulier de l'héparine, utilisé comme anti-coagulant [187].

Plus de détails concernant leur structure, leur biosynthèse et catabolisme, leurs interactions et leurs fonctions seront présentés dans les paragraphes suivants : II.4-7 et en chapitre III.

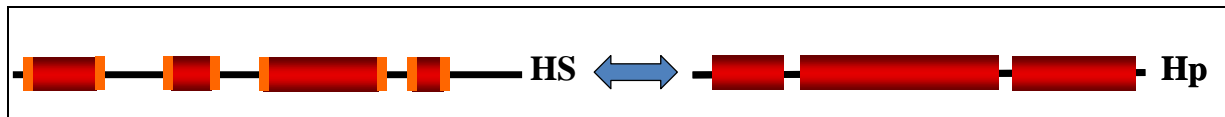


Figure 20 : Modèle de l'organisation des HS en domaines et comparaison avec l'Hp.

Les HS sont composés des domaines amplement sulfatés, domaines NS (illustrés par des rectangles rouges) délimités par des zones de transition moyennement sulfatées (rectangles oranges) et espacés par des zones peu sulfatées, domaines NA (représentés par la ligne noire). L'Hp contient la même répétition disaccharidiques que celles des HS mais est presque entièrement composée de domaines amplement sulfatés.

II.4.La biosynthèse des HS

Etant donné que les structures d'HS particulières sont à la base de réponses biologiques spécifiques [188], il semble logique que la cellule soit capable de synthétiser des motifs d'HS particuliers, capable d'interagir avec diverses protéines. En revanche, les HS, comme tous les glycanes, s'écartent du dogme central de la biologie qui postule que l'information est génétiquement codée. La question se pose alors de savoir comment les cellules peuvent synthétiser des structures d'HS particulières non codées qui sont à la base de leur fonction spécifique.

Une large gamme d'enzymes différentes, qui fonctionnent séquentiellement, sont à la base de la formation de ces structures complexes [174] (figure 21). La plupart d'entre-elles sont maintenant clonées et leurs fonctions enzymatiques sont connues. Cependant, l'ordre d'action de certaines enzymes de biosynthèse ainsi que leurs interactions avec d'autres enzymes restent à cette date encore méconnues [174].

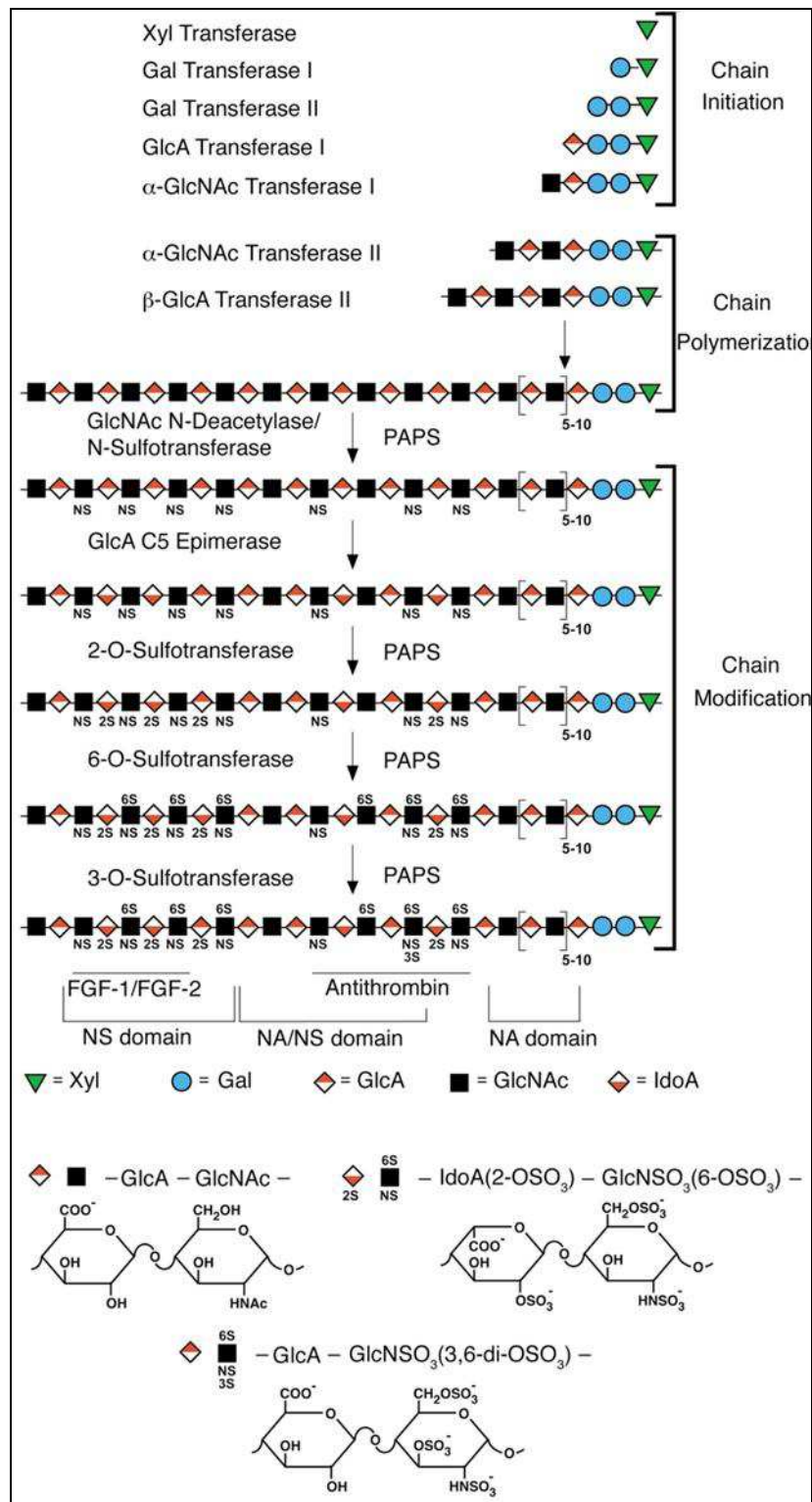


Figure 21 : Schéma de la biosynthèse des HS.

La biosynthèse des HS commence avec la synthèse d'un tétrasaccharide « linker ». Ce tétrasaccharide est commun entre les HS, l'Hp, les CS et les DS et est composé d'un xylose suivi de deux galactoses et d'une glucosamine. La polymérisation de la chaîne est catalysée par deux enzymes EXT1 et EXT2 ajoutant en alternance un GlcA et une GlcNAc. A cette étape, la synthèse des HS proprement dite commence, le différenciant de la biosynthèse d'autres GAG. Différentes enzymes de modification agissent ensuite l'une à la suite de l'autre sur la chaîne, comme décrit en paragraphe II.4.d. Ainsi, les séquences de reconnaissance de FGF et d'AT sont synthétisées.

D'après Esko et Lindahl, 2001 [189].

II.4.a. *La production du tétrasaccharide « linker » et son positionnement*

En amont de la séquence répétitive des HS se trouve un tétrasaccharide « linker » qui débute la synthèse des HS sur les corps protéiques.

Effectivement, suite à la synthèse du corps protéique dans le réticulum endoplasmique (RE), la biosynthèse des GAG débute par la xylosilation du corps protéique. Cette première étape post-traductionnelle a lieu tardivement dans le RE et continue dans la face cis de l'appareil de Golgi [190-191]. Elle consiste en une xylosyltransférase (XT) ajoutant un UDP-xylose (synthétisé dans le RE [190]) sur un résidu de sérine du corps protéique [192].

De nombreuses études [192-195] ont essayé de déterminer les pré-requis pour l'attachement de ce xylose qui débute la synthèse d'une chaîne d'HS sur des protéines. Après avoir découvert que le site d'attachement était un résidu de sérine du corps protéique, une séquence consensus autour de ce résidu de sérine a tout d'abord été proposée : Ser-Gly-X-Gly (avec X un acide aminé variable). Cependant, il a été très rapidement mis en avant qu'aucune séquence primaire stricte n'existait pour ces sites d'attachement. En revanche, il semble nécessaire que le site de glycosylation soit exposé à la surface de la protéine et qu'au moins deux résidus acides entourent le résidu de sérine [172-173, 192]. Tous les sites possibles ne sont pas nécessairement glycosylés, ceci dépendant de la concentration de l'UDP-xylose, de la xylosyltransférase, de la séquence primaire du site de glycosylation mais également des réactions compétitives par d'autres glycosylations [192].

Dans le Golgi l'attachement de deux D-galactoses successifs par des galactosyltransférases I et II (GalTI et GalTII) suivi d'un GlcA par la glucuronyltransférase I (GlcATI) complète la synthèse du tétrasaccharide « linker » $\text{GlcA}\beta 3\text{Gal}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Xyl}\beta 3\text{-L-[Ser]}$. La synthèse des chaînes d'HS, à proprement dite, peut ensuite avoir lieu. Toutes les prochaines étapes de biosynthèse des HS ont lieu dans la face médiane et trans de l'appareil de Golgi [196].

II.4.b. *Le choix de l'élongation Hp/HS ou CS/DS.*

Suite à la synthèse du tétrasaccharide « linker », une α -GlcNAc Transférase I initie la synthèse des HS proprement dite, car le tétrasaccharide « linker » est commun entre les CS/DS et les HS/Hp. Il semble que c'est la séquence autour du résidu de sérine qui détermine le choix de l'élongation CS/DS ou HS/Hp [192, 197].

En dépit du fait que les mécanismes de sélection ne soient pas encore complètement compris, l'initiation de la biosynthèse des CS/DS semble être fait par défaut alors que la synthèse des

HS/Hp nécessite un signal positif [192, 198]. Des répétitions de Ser-Gly espacées idéalement de 7-9 résidus ainsi que la proximité de résidus hydrophobes favoriseraient l'initiation des HS/Hp alors qu'aucun motif particulier n'a été identifié aux alentours du site de fixation des CS/DS. Pour cette raison une hypothèse prévoit que la α -GlcNAc Transférase I contient un domaine catalytique et un domaine de reconnaissance, liant des résidus autour du site de glycosylation. Ce domaine de reconnaissance sera absent dans β -GalNAc Transférase I expliquant que l'initiation de la biosynthèse des CS/DS soit faite par défaut. Par ailleurs il a également été postulé que des modifications du tétrasaccharide, comme des sulfatations ou des phosphorylations, favoriseraient plutôt la synthèse des CS/DS [172, 196, 199].

II.4.c. *La polymérisation*

L'HS copolymérase forme la partie répétitive des HS. Cette enzyme est bifonctionnelle du fait d'une double activité enzymatique : la GlcA transférase et la GlcNAc transférase. Deux enzymes sont responsables de cette activité, EXT1 et EXT2, formant un hétéro dimère localisé dans le complexe de l'appareil de Golgi où elles semblent coopérer d'une façon encore inconnue à ce jour [199-201].

II.4.d. *Les modifications du polymère*

Au cours de la polymérisation de la chaîne dans l'appareil de Golgi les disaccharides de base peuvent subir différentes modifications (figure 22). Six modifications peuvent être rencontrées : (1) la déacétylation de la GlcNAc générant un groupement amine qui est dans la plupart des cas immédiatement (2) sulfaté par une activité N-sulfotransférase, (3) la C5-épipimérisation du D-GlcA en un L-IdoA, (4) la 2-O-sulfatation du IdoA et plus rarement celle du GlcA, (5) la 6-O-sulfatation ou encore (6) la 3-O-sulfatation des glucosamines. L'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS) est le donneur universel des groupements sulfates ajoutés aux différentes positions et elle contient l'énergie nécessaire pour transférer son groupement sulfate vers le donneur approprié. Sa concentration détermine l'ampleur de la sulfatation, une grande concentration de PAPS rallonge les domaines NS [202].

Ces modifications n'ont pas lieu tout au long de la chaîne mais sont concentrées dans les domaines (nommés domaines NS avec une taille allant de 2 à 8 disaccharides), espacés par des domaines peu modifiés (domaines NA d'environ 15 disaccharides), au bord des domaines

sulfatés où l'on trouve des zones de transition moyennement sulfatées (appelées domaines NA/NS) [203].

La longueur variable des chaînes, les différentes modifications ainsi que l'espacement et la longueur des domaines modifiés donne lieu à l'importante hétérogénéité de la structure des HS.

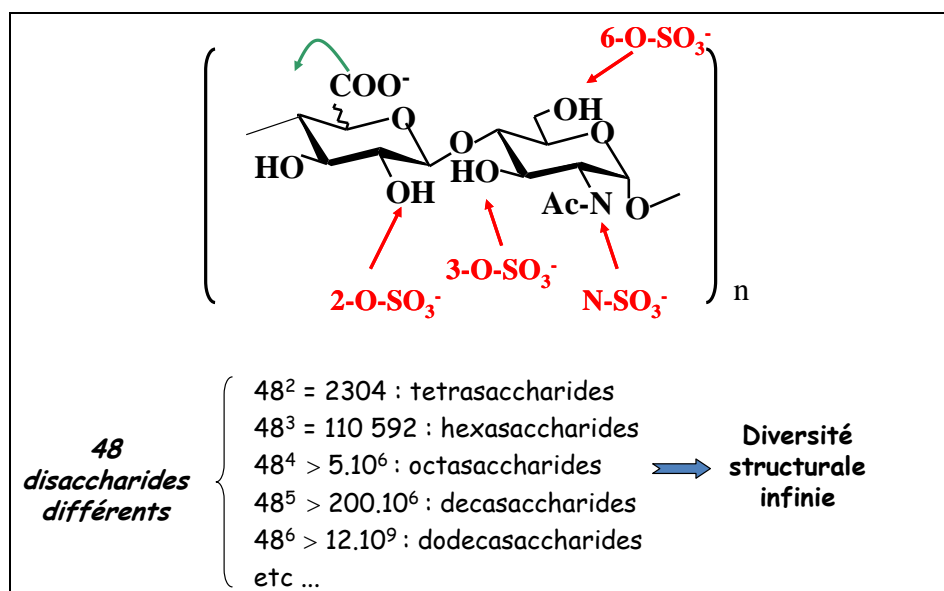


Figure 22 : Modification et diversité des HS.

Les six différentes modifications possibles du disaccharide de base composé d'un acide hexuronique et d'une glucosamine : la N-déacétylation suivie de la N-sulfatation, l'épimérisation de GlcA en IdoA, la 6-O-sulfatation de la GlcNAc, la 2-O-sulfatation de l'IdoA, la 3-O-sulfatation de la GlcNS. La diversité structurale théorique ainsi créée est très importante.

• La N-déacétylase-N-sulfotransférase

La première enzyme modifiant le disaccharide de base est la N-déacétylase-N-sulfotransférase (NDST). Elle est pré-requise pour l'action d'autres enzymes de modification. C'est par conséquent elle qui génère la structuration de la chaîne en domaines NA, NS/NA et NA. La NDST catalyse les deux réactions : la N-déacétylation et la N-sulfatation [204-205]. Quatre isoformes caractérisées par une haute homologie de séquence et de structure sont connues à ce jour. Le ratio de l'activité N-déacétylation/N-sulfatation est différent selon les isoenzymes. La NDST3 a par exemple une plus grande activité de N-déacétylation comparée à l'activité N-sulfatation générant de ce fait des GlcNH_3 . Cette modification cependant assez peu fréquente [204].

Le fait que les modifications soient retrouvées concentrées dans les domaines NS et le fait que l'action des NDST soit un pré-requis pour les autres enzymes de modification, suggère que cette enzyme ne se dissocie pas de la chaîne après une réaction enzymatique mais qu'elle a une action processive [174].

- **La C5-épipimérisation**

La C5-épipimerase (C5Epi) catalyse la conversion du D-GlcA en L-IdoA. Seule une isoenzyme est connue et son activité est réversible *in vitro*. La sulfatation en position 2 de l'IdoA/ GlcA ou celle en position 6 de la GlcNS bloque cependant l'action retour de la C5Epi sur les résidus L-IdoA. Ceci prouve que la C5Epi agit avant les sulfotransférases [206-207]. Etant donné que la C5Epi reconnaît uniquement les séquences N-sulfatées il est également évident qu'elle agit après la NDST [202, 207].

L'épipimérisation du D-GlcA en L-IdoA confère une flexibilité supplémentaire aux HS puisque contrairement au D-GlcA, qui n'a normalement qu'une conformation (4C_1), le L-IdoA peut adopter plusieurs conformations (1C_4 , 4C_1 , 2S_0) grâce à la flexibilité de l'anneau pyranose formé [208]. Il est à noter que le groupement sulfate en position 2 peut favoriser une conformation particulière.

- **La 2-O-sulfotransférase**

La 2-O-sulfotransférase (2OST) se présente uniquement sous une isoforme et ajoute un groupement sulfate en position 2 des IdoA et des GlcA. La 2OST a une nette préférence pour les IdoA comparés aux GlcA. Cependant si l'enzyme forme un complexe avec la C5Epi, il a été montré qu'aucune préférence de substrat n'est observée [209-210]. Sur une chaîne d'HS, 50 à 90 % des IdoA sont transformés par la 2OST. Une telle variabilité du degré de 2-O-sulfatation semble provenir de différents facteurs de régulation comme par exemple la taille des domaines NS, le degré de N-déacétylation et de N-sulfatation ou encore la présence des groupements 6-SO₄. [174, 210].

- **La 6-O-sulfotransférase**

Trois 6-O-sulfotransférases (6OST) différentes ont été identifiées chez les mammifères [211]. Les groupements 6-O-sulfate des glucosamines sont retrouvés dans des séquences variables. La plupart se trouvent dans des domaines NS, souvent juxtaposés avec des groupements 2-O-sulfate et parfois combinés avec des groupements 3-O-sulfate. Néanmoins, ils sont aussi présents dans des domaines NS/NA, sur des GlcNAc ou GlcNS. Il est donc tentant de penser que les différentes isoformes ont des substrats différents. Néanmoins, aucune étude n'a pu démontrer l'existence de séquences de substrat spécifique *in vitro* qui expliquerait les différents 6-O-sulfatations retrouvés *in vivo*. Une autre hypothèse plausible est celle où les différentes isoformes n'ont pas de substrats remarquablement différents mais que leur association avec d'autres enzymes de biosynthèse définirait leur substrat et ainsi la production des séquences d'HS particulières [189, 212].

- **La 3-O-sulfotransférase**

L'importance des groupements sulfates en position 3 sur certaines GlcN est incontestable, du fait de leur implications dans la reconnaissance de protéine comme l'antithrombine III ou glycoprotéine gD du virus de l'herpes simplex [213-214]. Cette modification, qui se trouve généralement dans les domaines NS, est rare. Elle est apportée par la 3-O-sulfotransférase (3OST) dont 5 isoenzymes ont été décrites, chacune ayant une expression tissu spécifique et une séquence de substrat particulière [174, 215].

II.4.e. *Le concept « Gagosome »*

Il est remarquable d'observer la vitesse et la précision de structures d'HS particulières qui sont synthétisées, malgré l'absence d'un code pour leur production. Un concept, inventé par Esko et Schelleck en 2002 [174], explique ces phénomènes par une association de différentes enzymes de biosynthèse formant un complexe appelé un « gagosome » [174] (figure 23). Plusieurs indices penchent en faveur de cette hypothèse. Premièrement, un complexe entre le EXT 1 et le EXT 2 et entre la C5Epi et la 2OST a déjà été observé [200]. Deuxièmement, étant donné qu'une chaîne entière d'HS est complètement sulfatée en moins d'une minute, une association des enzymes de modification d'HS à leur substrat est fort probable [216]. Avec un tel « Gagosome » la génération de structures d'HS particulières peut être contrôlée par le niveau d'expression des enzymes de biosynthèse, et par leur mode d'association. Cependant, la question de savoir si la biosynthèse des HS est régulée ou au contraire hasardeuse est récurrente. Il s'avère que les HS issus de différents tissus sont remarquablement différents entre eux mais identiques lorsqu'ils sont issus d'une source donnée. Ceci suggère fortement que l'expression des HS est donc strictement régulées, avec des mécanismes cependant encore mal connus [217-218].

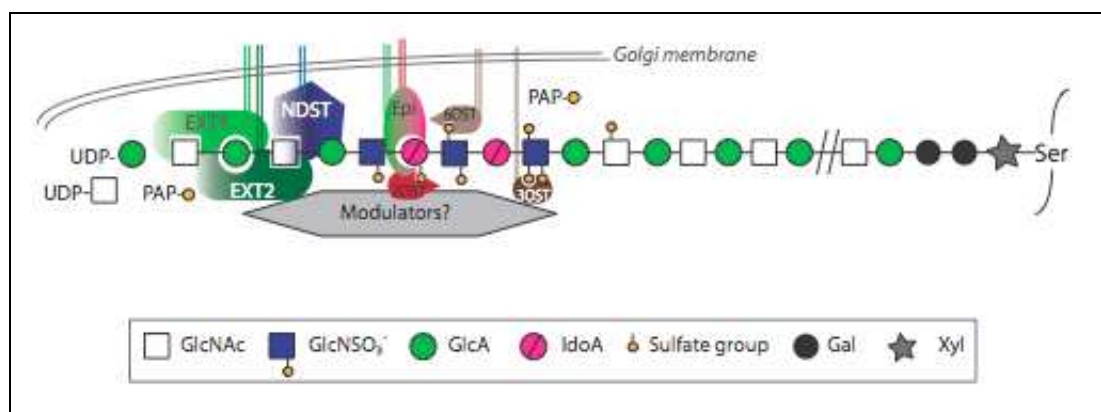


Figure 23 : Schéma du "Gagosome".

Dans l'hypothèse du « Gagosome », où les enzymes de biosynthèse des GAG forment un complexe, les différentes enzymes agissent de façon consécutive sur une chaîne d'HS naissante. L'existence de ce « Gagosome » est spéculative bien que l'interaction entre certaines enzymes de biosynthèse d'HS ait été démontrée.

D'après Lindahl et Li ,2009 [219].

II.5.La structure des héparanes sulfates

Si nous observons, dans un premier temps, la composition des HS nous remarquons immédiatement la quantité des groupements sulfates présents. Ils influencent largement la structure du fait de leur charge et de leur encombrement stérique. Du fait de la répulsion stérique entre les différents groupements sulfates, nous pouvons supposer que les HS sont des structures plutôt étendues. Une certaine flexibilité semble néanmoins indispensable afin d'expliquer la spécificité d'interaction observée sans grande variabilité entre leurs groupes fonctionnels. Ces chaînes polyanioniques ont ainsi une « distribution » précise des groupements sulfates et carboxyles permettant de lier certaines protéines à haute affinité.

De nombreuses études ont déjà examiné la structure de l'Hp [220-222]. L'Hp est dotée d'une flexibilité grâce à la présence de ses IdoA. Effectivement, les IdoA peuvent adopter diverses conformations stables, avec toutefois des préférences pour certaines conformations suivant les modifications présentes dans le disaccharide qui les contient, contrairement au GlcA qui n'est stable que dans une conformation donnée [222-224]. A l'inverse une répulsion stérique des groupements sulfates présents rigidifie la chaîne d'Hp. Pour cela, les domaines NS des HS sont considérés comme des fragments d'Hp et les domaines NA sont comparés à ceux de l'heparosan, polysaccharide bactérien de structure identique à celle des HS non sulfatés et non épimérisés. Pour ces derniers, ayant uniquement des GlcA, une flexibilité provient des liaisons glycosidiques capables d'adopter plusieurs conformations mais également de l'absence de groupements sulfates entraînant moins de répulsion stérique. Ceci peut modifier l'orientation étendue des HS par des « coudes » au niveau des domaines NA des HS [225].

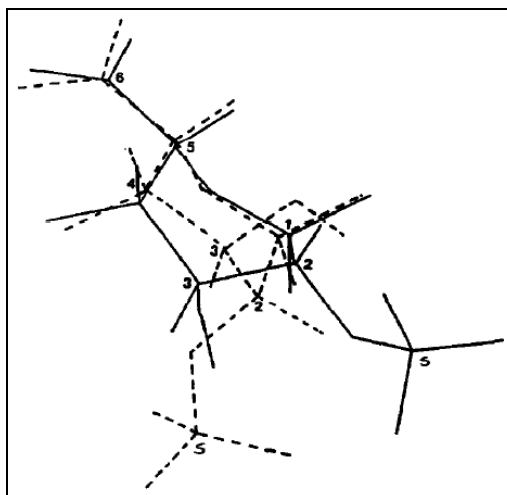


Figure 24 : Structure de l'acide iduronique.

Superposition (des liaisons C-1-0-1 et liaison C-4-0-4) de l'IdoA en conformation 1C_4 chaise et 2S_0 bateau. Une différence remarquable des positions des carbones cycliques (C3 et C2) et des groupements fonctionnels (surtout sur le C5) est observée.

D'après Mulloy *et al.*, 1994 et mulloy *et al.*, 2000 [224, 226].

II.6.Le trafic des PG

Après leur synthèse dans l'appareil de Golgi, les HSPG doivent atteindre la membrane plasmique afin d'accomplir leur rôle, en particulier dans la liaison avec des molécules de signalisation. Les HS sont transportés du réseau trans de l'appareil Golgi jusqu'à la membrane plasmique dans des vésicules de stockage. Contrairement à la majorité des protéines membranaires, sécrétées par la voie constitutive ne nécessitant aucun signal, les HSPG sont issus de la sécrétion contrôlée nécessitant un peptide signal pour orienter ces derniers vers la membrane. Cette sécrétion contrôlée est notamment importante dans les cellules épithéliales afin de distribuer les HSPG de façon asymétrique, différenciant la face apicale de la face basolatérale. Les motifs de signalisation ne sont pas tous identifiés mais se trouvent vraisemblablement dans les corps protéiques des HSPG. Cependant, il n'est pas exclu que ces signaux se retrouvent dans la partie GAG des HSPG, éventuellement par le biais de l'interaction de cette partie avec des protéines. Des séquences signal ont déjà été identifiées pour certains syndécans : 12 acides aminés du peptide C-terminal du syndécane-1 provoquent sa distribution basolatérale dans des cellules MDCK [196].

II.7.La catalyse et le remodelage des HS

A partir du moment où les HS atteignent la membrane plasmique, ils sont susceptibles de lier leurs protéines d'intérêt. Après ces interactions il est important qu'il y ait un recyclage des HS présents sur la surface cellulaire afin de renouveler les interactions protéine:HS et de limiter le temps de signalisation induit par ces interactions. Il est également important que la cellule adapte les HS exposés selon son état : le cycle cellulaire, le stade de développement ainsi que son stade métabolique. Pour cette raison la cellule a mis en place plusieurs voies de renouvellement ou de modifications des HS (figure 25). Leur temps présent sur la surface est cependant court, compris entre 3 h et 8 h [227].

Tout d'abord, *via* l'endocytose, les HS et leurs protéines liées sont internalisés puis catalysés. Ce mécanisme de catalyse n'est bien sûr pas exclusivement utilisé par les HS mais également par de nombreuses autres protéines membranaires. Ensuite, le shedding ou l'action de sulfatases et d'héparanases sécrétées forment une alternative à ce processus puisqu'elles remodelent les HS présents sur la surface cellulaire.

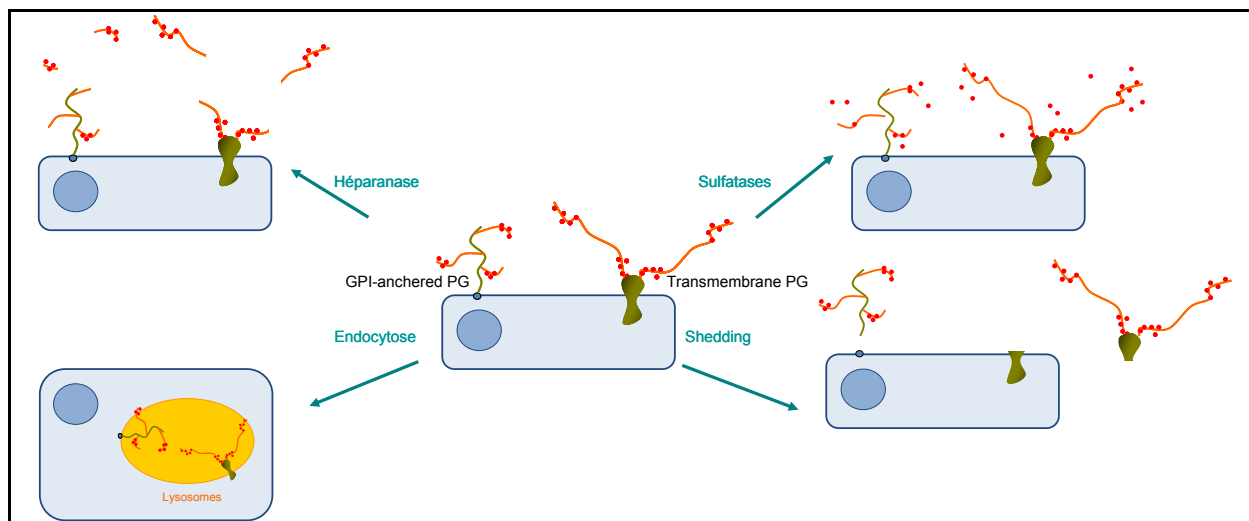


Figure 25 : Mécanismes de remodelage des HS présents sur la surface cellulaire.

Les HS sont remodelés très rapidement à la surface cellulaire par différents mécanismes. Les héparanases sont des endoglycosidases qui coupent les HSPG dans leurs chaînes oligosaccharidiques. Les sulfatases remodelent les HSPG par l'élimination de certains groupements 6-O-sulfate spécifiques. Le « shedding » relargue les ectodomains et de ce fait les chaînes à HS attachées à une partie du corps protéique ou une partie de l'ancrage de type GPI. Enfin, les HSPG peuvent également être endocytés et dégradés dans les lysosomes.

II.7.a. L'endocytose

La voie, la plus connue de renouvellement des protéines membranaires, est celle de l'endocytose également utilisée par les HSPG. Dans un premier temps, il a d'abord été suggéré que les HS nécessitaient une complexation avec les récepteurs des LDL (low density lipoproteines) pour activer la cascade menant à l'endocytose. Plus tard, il a été démontré que ceci n'est pas nécessaire car les endodomains des HSPG contiennent eux-mêmes les séquences de signalisation pour l'endocytose [228].

Les HSPG sont par la suite dégradés et recyclés dans des lysosomes par l'action de diverses exoglycosidases, sulfatases et N-deacétylases. Ces enzymes agissent en cascade afin de produire des sucres individuels complètement dépourvus de leurs groupements sulfates et acétyles. Les groupements sulfates, les groupements acétyles ainsi que les monosaccharides peuvent ensuite être réactivés et réutilisés par la cellule [229]. Un défaut de dégradation des HSPG provoque l'accumulation des chaînes HS non ou partiellement dégradées et est associé aux maladies, comme la mucopolysaccharidose chez l'homme [230].

II.7.b. *Le shedding*

Le « shedding » s'applique à toute protéine membranaire, il implique leur clivage relargant leurs ectodomains, parties extracellulaires de ces protéines. Dans le cas des HSPG ceci provoque la libération d'HSPG solubles dans le milieu extracellulaire. Des protéases spécifiques, souvent des metalloproteinases sont à la base du shedding. Pour le cas particulier des HSPG ancrés par un GPI, le shedding est exécuté par des phospholipidases sécrétées.

Ce processus est particulièrement important car il réduit le nombre des sites de liaison d'HS sur la surface cellulaire. Simultanément, il y a la libération des HSPG et de leur protéines complexées qui peuvent ensuite agir de façon autocrine et paracrine. De plus en plus, l'importance du shedding est mise en avant car il est associé à différents processus pathophysiologiques. Le shedding du syndécan-1, par exemple, est lié au fonctionnement adéquat et correcte de l'inflammation par exemple par libération des chimiokines liées aux HS du syndécan-1 [189, 227, 231-232].

II.7.c. *Les sulfatases*

Les endoglucosamine-6-sulfatases n'ont été découvertes que récemment. En effet ce n'est qu'en 2001 que la première sulfatase (QSulf-1) fût identifiée chez la caille. Ensuite deux sulfatases ont été identifiées et clonées chez l'homme, Sulf-1 et Sulf-2. Elles remodelent les HS extracellulaires par hydrolyse de leurs groupements 6-O-sulfate. Sulf-1 et Sulf-2 ont la même spécificité de substrat agissant uniquement sur les domaines NS, majoritairement sur les IdoA(2S)-GlcNS(6S) mais parfois aussi sur les IdoA-GlcNS(6S) [233-235]. Les différences entre Sulf-1 et Sulf-2 ne sont pas encore claires, ils pourraient avoir une action synergique ou redondante car l'inactivation des gènes codant pour Sulf-1 ou Sulf-2 se traduit par un phénotype relativement modéré contrairement au KO de Sulf-1 et de Sulf-2 qui est létal.

Il est important de noter que ces sulfatases ne sont pas les mêmes que ceux qui dégradent les HS dans les lysosomes. En effet, deux différences sont à noter, les sulfatases du catabolisme sont des exosulfatases et non des endosulfatases, qui opèrent dans un milieu acide contre un milieu neutre pour Sulf-1 et Sulf-2.

L'action de Sulf-1 et Sulf-2 a des conséquences considérables pour la cellule car la désulfatation des HS peut libérer les protéines qui y sont associées. S'il y a, par exemple, des facteurs de croissance liés aux HS, le retrait des groupements 6-O-sulfate diminue leur affinité et entraîne la libération de ces facteurs de croissance, changeant ainsi leur signalisation (promotion de signalisation dans le cas de Wnt mais inhibition pour FGF-2). C'est pour cette raison que Sulf-1 et Sulf-2 sont associés à des processus homéostatiques, ou au cancer ainsi qu'au développement [234].

II.7.d. *Les héparanases*

L'héparanase est une endo- β -glucuronidase qui hydrolyse les HS à la surface cellulaire, probablement dans des domaines de faible sulfatation. Elle produit des fragments de 4 à 7 kDa (correspondant au dp12-dp24), altérant de manière considérable la structure des HS. De plus, les HS coupés sont relâchés dans la MEC ainsi que les protéines associées. Cette stratégie est notamment utilisée par des cellules cancéreuses pour relâcher les facteurs de croissance complexés par les HS et par conséquent l'inhibition de l'héparanase représente une stratégie anticancéreuse plausible [236].

Seule une héparanase est présente dans des cellules de mammifères mais trois lyases ont été identifiées dans des cellules bactériennes (figure 26). Ces héparinases bactériennes (*Flavobacterium heparinum*) ont tous un site de clivage particulier et sont souvent utilisées

comme outil d'analyse en laboratoire (héparinase - Hep - I, II et III). Une structure obtenue par modélisation a récemment été proposée pour l'héparanase humaine [237], expliquant son mécanisme enzymatique mais n'élucidant pas la structure des HS clivés.

L'héparanase ne reste pas dans la MEC, mais est endocytée lors de son interaction avec les HS ou avec d'autres protéines présentes sur la surface cellulaire (c'est le cas pour la mannose 6-sulphate receptor, le lipoprotéine receptor-related protein,...) connues pour interagir avec l'héparanase. De cette façon la quantité des HS clivés est régulée [236].

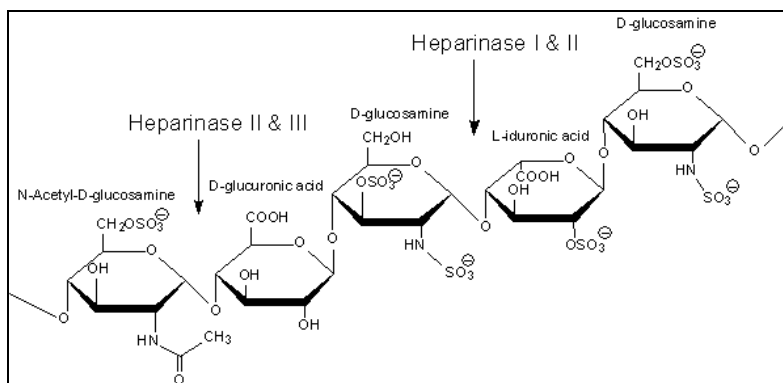


Figure 26 : Site de coupure par les héparinases I, II et III.

Les héparinases sont des endoglycosidases qui coupent les HS ou l'Hp de manière site-spécifique, entre la liaison glycosidique $\alpha(1-4)$ entre une glucosamine et un acide hexuronique. Plus précisément, l'héparinase I coupe entre une GlcNS et un IdoA O-sulfaté, l'héparinase II entre une GlcNS ou une GlcNAc et un IdoA ou un GlcA. L'héparinase III coupe entre GlcNAc et un GlcA, ainsi elle n'est pas, ou très peu, active sur l'Hp. Elles ne sont pas produites chez les mammifères mais souvent utilisées en laboratoire.

D'après Linhardt *et al.*, 1990 [238].

III. L'interaction des protéines avec les héparanes sulfates

Les HS forment un « passage obligatoire » pour les protéines présentes dans le milieu extracellulaire qui vont interagir avec leur récepteur présent sur la membrane plasmique, du fait de leur omniprésence dans le glycocalyx. Ils sont également présents dans la MEC. Il est donc évident que de multiples interactions avec des protéines sont plausibles et effectivement des centaines de protéines sont à cette date connues pour interagir avec les HS.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les HS sont dotés d'une structure très particulière qui est extrêmement variable. Les domaines NS des HS sont fortement chargés négativement. Ce sont ces parties qui interagissent avec des AA basiques protéines, majoritairement par le biais d'interactions électrostatiques. Ses zones d'interaction avec des HS sur la protéine sont souvent regroupé en domaines. Plus précisément, ce sont les résidus de lysine, d'arginine et plus rarement des résidus d'histidine des protéines qui lient les groupements sulfates et carboxyles des HS. Outre ces résidus basiques, les protéines peuvent fixer des cations qui peuvent aussi intervenir dans l'interaction avec des HS. L'importance des ions zinc est notamment démontré pour l'interaction de l'endostatine avec les HS [239]. Cependant ces contacts ioniques ne sont pas suffisants pour expliquer l'affinité et la spécificité de l'interaction entre les protéines et les HS : les structures obtenues par cristallographie aux rayons X démontrent l'importance d'autres contacts reposant sur des interactions hydrophobes et des forces de van der Waals. Des séquences d'AA consensus pour la liaison aux HS ont été définies : XBBBXXBX, XBBXBX et XBBBXXBBBXXBBX avec B étant un résidu basique et X un résidu hydrophile. La structure secondaire de ces peptides permet l'orientation des groupements basiques vers l'extérieur de la protéine, et sont donc accessibles aux HS [240-241]. Ces interactions sont souvent étudiées à pH neutre, mais dans certaines conditions cellulaires le pH local peut s'acidifier et de ce fait augmenter l'affinité entre les protéines et les HS. On peut notamment observer ce phénomène lors d'une inflammation ou au sein d'une tumeur [242-243]. Ceci est particulièrement important lorsque le site d'interaction comporte des histidines car selon le pH elles peuvent être chargées ou non, du fait de leur pKa voisin de 6,0 [187]. D'autre part, la présence des ions, surtout des ions divalents, peut contribuer à l'interaction entre une protéine et un GAG [187].

Avant de s'intéresser en détail à certains sites d'interaction, le rôle clé de ces interactions protéines-GAG sera présenté avec quelques exemples.

III.1. Fonctions d'interaction de protéines avec des GAG

Grâce à leur présence dans la MEC ainsi que sur la surface cellulaire, les HS interagissent avec de nombreuses protéines et régulent leurs activités (figure 27). Le rôle de ces interactions sont résumées sur la figure 28. Seuls quelques exemples seront détaillés ci-dessous. Par l'interaction avec des protéines, les HS sont impliqués dans des processus biologiques très divers comme la signalisation, la morphogénèse, le développement, l'inflammation, les infections virales ... [219, 244]. D'un point de vue mécanistique, ces interactions modifient la structure, la stabilité, l'activité et/ou la concentration locale des protéines.

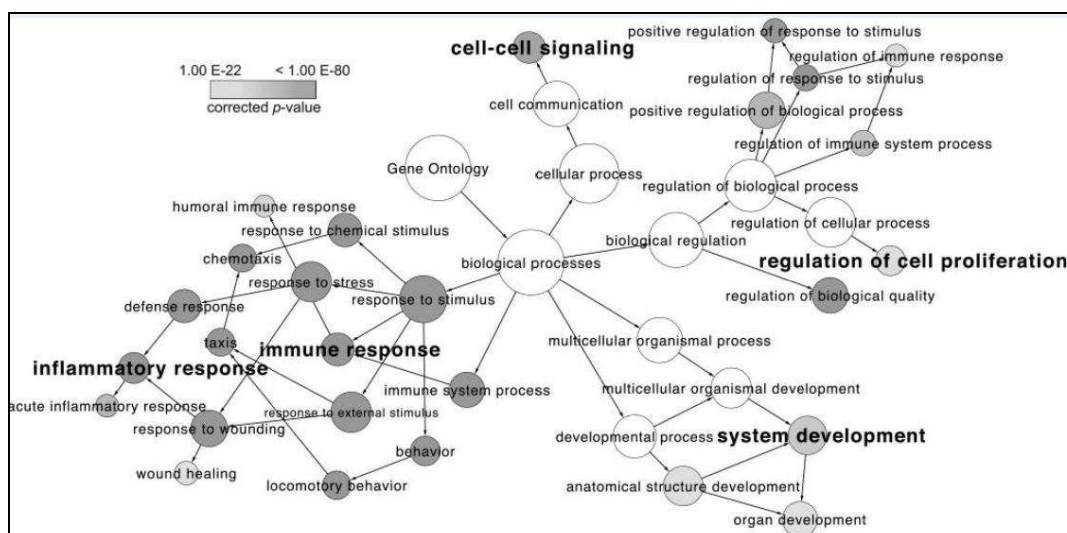


Figure 27 : Processus biologiques dans lesquels les protéines liant les HS sont impliquées.

Les fonctions de 435 protéines humaines, connues pour interagir avec les HS, sont analysées par « gène ontology », puis représentés par des cercles. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de protéines liant les HS impliquées dans un processus donné. *Via* cette analyse, une forte corrélation entre les fonctions dans lesquelles les interactions protéines-HS sont impliquées et celles essentielles pour des organismes multicellulaires (la signalisation intracellulaire, la réponse immunitaire et le développement, etc.) est remarquée.

D'après Ori *et al.*, 2011[245].

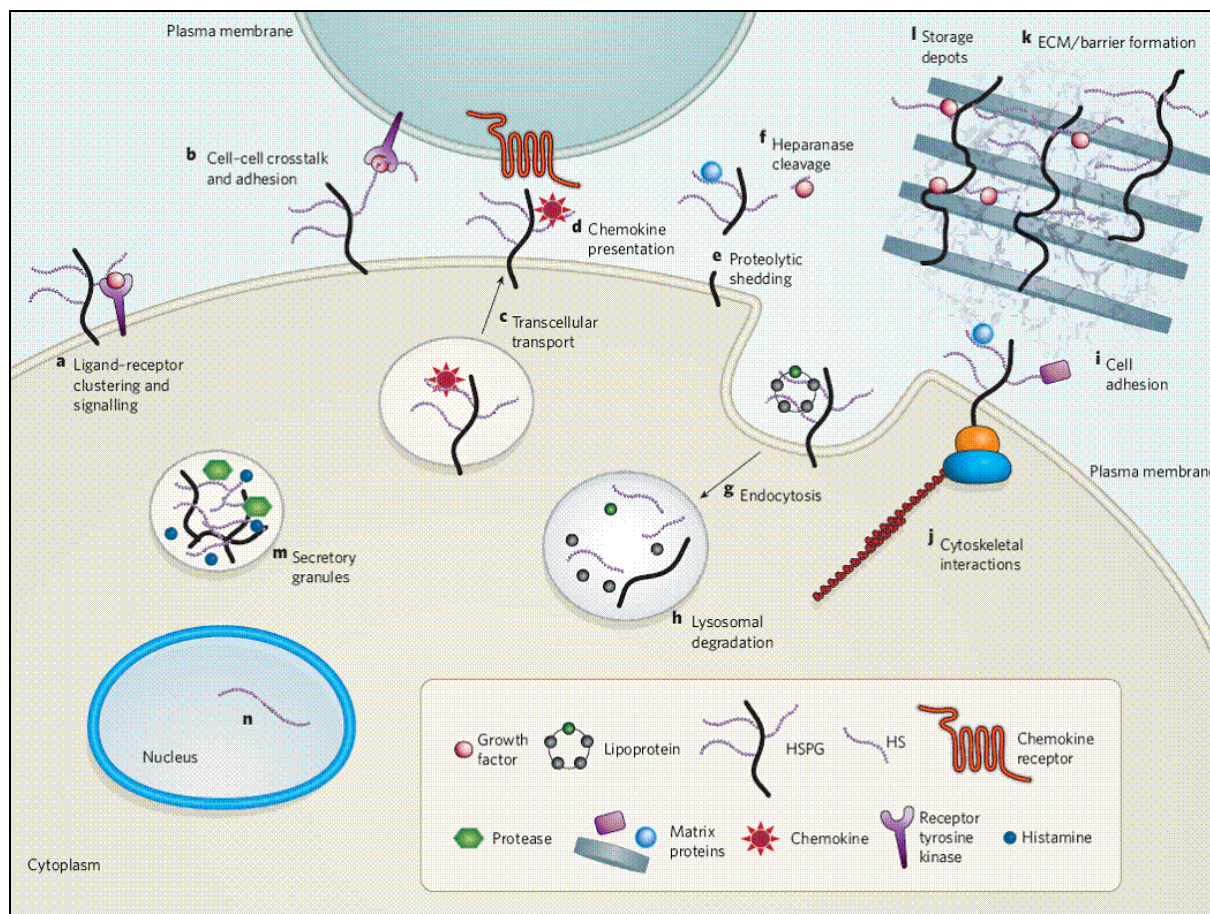


Figure 28 : Présentation des diverses fonctions dans lesquelles les HS sont impliqués.

(a,b) Les HS interagissent avec des facteurs de croissance et leur récepteur présent sur la même cellule où sur les cellules voisines, ils promeuvent ainsi leur signalisation. (c) Les chimiokines sont liées aux HS lors de leur transport vers la membrane plasmique. (d) Leurs interactions avec les HS sur la membrane plasmique contribuent à la formation et/ou stabilisation de gradients chimioattractants. Les HSPG, présents sur la surface cellulaire, sont dégradés par différentes molécules de dégradation (e) celles provoquant le « shedding et (f) les héparinases. Une autre manière de renouveler les HS présents sur la surface est (g) leur endocytose et (h) leur dégradation dans les lysosomes. Les HS participent également aux interactions cellules-matrice extracellulaire par leurs interactions avec (i) des protéines d'adhésion cellulaire, leur corps protéique peut également interagir avec (j) des composants du cytosquelette. Les HS présents dans la MEC (k) forment une barrière et (l) stockent des facteurs de croissance et des morphogènes. (m) La serglycine, un HSPG intracytoplasmique stocke des protéases et l'histamine dans les granules de sécrétion.

D'après Bishop *et al.*, 2007 [244].

III.1.a. Les HS provoquent un changement conformationnel

L'exemple le plus connu et certainement le plus étudié des interactions entre une protéine et les HS est celui de l'antithrombine III (ATIII), illustré sur la figure 29.

Le rôle de cette interaction est double et essentiel pour le maintien de la fluidité du sang ou à l'inverse pour sa coagulation. L'équilibre entre la fluidité et la coagulation du sang dépend du taux d'inhibition de thrombine ou du FXa par l'ATIII. L'ATIII circule à haute concentration dans le sang mais devient capable d'inhiber la thrombine ou le FXa uniquement après un changement de conformation. Ce changement de conformation est induit par l'interaction de

l'ATIII avec une séquence pentasaccharidique particulière présente dans des domaines NS des HS - ou de l'Hp -. Ces changements structuraux ont été caractérisés en détail grâce à l'obtention de la structure de l'antithrombine seule et en complexe avec ce pentasaccharide spécifique [246]. Ces changements se caractérisent par une augmentation de la flexibilité d'une boucle ainsi que par un changement d'orientation d'un résidu d'arginine vers l'extérieur de la protéine, tous deux essentiels pour l'interaction avec la thrombine ou le FXa.

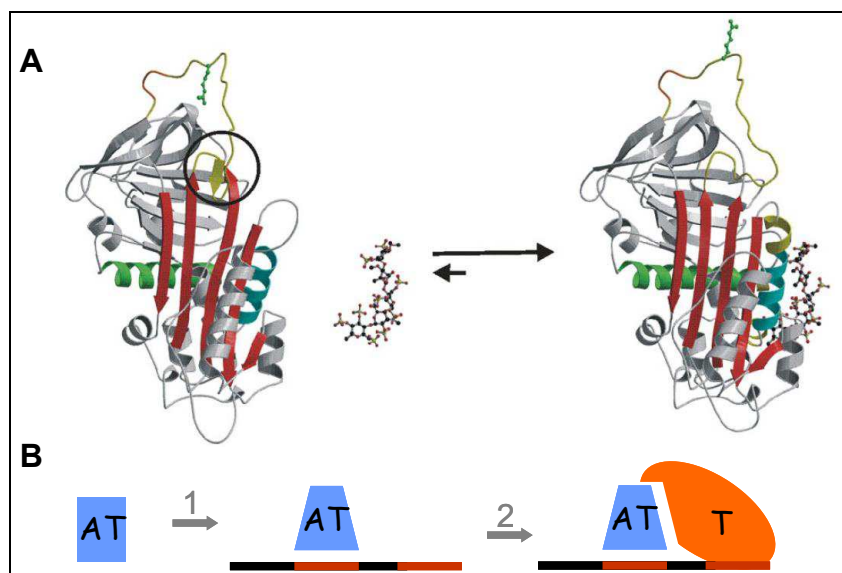


Figure 29 : Mécanisme de régulation de l'activité enzymatique de l'ATIII.

A. Changement de conformation de l'ATIII par un pentasaccharide spécifique de l'héparine. Ce changement de conformation inclut l'expulsion de la région entourée par un cercle noir où se trouve la RCL (reactif center loop, représentée en jaune), vers l'extérieur de la partie globulaire de la protéine. Ceci provoque un changement d'orientation d'un résidu d'arginine et une augmentation de la flexibilité, toutes les deux nécessaires pour l'interaction avec la thrombine ou avec le FXa. **B. Mécanisme d'inhibition de la thrombine par l'antithrombine et les HS.** Un changement de conformation de l'ATIII est nécessaire pour qu'elle puisse inhiber la thrombine (T). Ce changement de conformation est induit par l'interaction de l'ATIII avec l'Hp ou les domaines NS des HS (1). L'ATIII peut ensuite lier des protéases tel que le facteur Xa ou la thrombine. Là encore, l'Hp ou les HS jouent un rôle car la thrombine lie aussi l'Hp ou les HS. Cette fixation rapproche les deux partenaires et ils ont ainsi une plus forte probabilité d'interagir (2).

D'après Olson *et al.*, 1992 [247] et Li *et al.*, 2004 [246]

III.1.b. Les HS favorisent les contacts protéines-protéines

Une étude qui a cherché à détailler le mécanisme de formation du complexe entre l'ATIII, la thrombine et une molécule d'Hp démontre un rôle supplémentaire des GAG dans l'interaction entre deux protéines. En effet, un fragment d'Hp de taille supérieure au pentasaccharide accélère la formation du complexe ATIII:thrombine par rapport au pentasaccharide. Il est alors démontré qu'après le changement de conformation de l'ATIII, l'Hp fixe également la thrombine. Dans la formation de ce complexe, l'Hp qui fixe l'ATIII et la thrombine permet le rapprochement de ceux-ci et augmente la vitesse de formation du complexe ATIII:thrombine.

Par contre dans le cas de l'interaction entre l'ATIII et le FXa, aucune différence de vitesse de formation du complexe n'est observée entre le pentasaccharide et un fragment d'Hp de taille supérieure. Par conséquent, dans ce cas l'Hp ne semble pas ponter les deux protéines [247-248].

Un autre exemple où l'interaction des protéines avec les HS augmente les contacts protéine-protéine est celui de l'oligomérisation des chimiokines. Ainsi RANTES (CCL5) s'oligomérisise *via* l'interaction avec les HS (figure 30) [249]. Cette oligomérisation semble essentielle pour que RANTES active les récepteurs couplés aux protéines G et déclenchent ensuite l'activité chimiotactique *in vivo* [250].

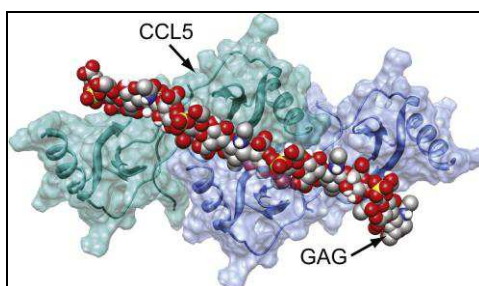


Figure 30 : Structure du tétramère de RANTES en interaction avec l'Hp.

Modèle de la structure du complexe entre le tétramère de RANTES et l'Hp *via* différentes approches : NMR, SAXS, footprinting,...

D'après Wang *et al.*, 2011 [250].

III.1.c. Les HS stabilisent des gradients de chimiokines

Des chimiokines sont des petites cytokines chimiotactiques qui induisent la migration directionnelle des cellules dans les tissus. Ces cytokines sont capturées par les HS de la MEC ou à la surface de cellules permettant ainsi la formation ou la stabilisation d'un gradient de concentration, appelé gradient chimiotactique, orientant les cellules en déplacement. L'implication des HS dans la formation des gradients a été démontrée par la production des mutants de chimiokines dépourvus de leur site d'interaction aux HS tout en étant fonctionnellement actifs (figure 31). En effet, ils n'arrivent plus à établir un gradient et par ce fait ils ne déclenchent plus la migration orientée des cellules [251-252].

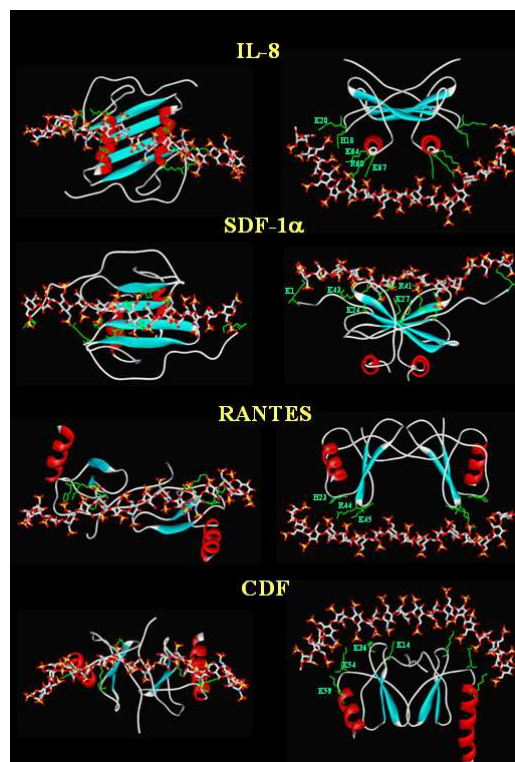


Figure 31 : Illustration des sites d'interaction des HS sur les chimiokines.
Représentation de modèles de complexes entre des chimiokines et des fragments d'Hp.
D'après Lortat-Jacob *et al.*, 2002 [253].

III.1.d. Les HS en tant que co-récepteur

Les FGF ont un rôle primordial dans divers processus biologiques comme le développement embryonnaire, l'homéostasie, des processus régénératifs. Pour indication, les 22 FGF identifiés chez l'homme aujourd'hui, interagissent avec un des 7 FGFR afin d'activer leur voie de signalisation. Il a été démontré en 1991, et ce par deux équipes indépendantes, que la présence de l'Hp ou d'HS était absolument nécessaire pour que les FGF puissent activer leurs récepteurs à haute affinité [254-255]. Il est à noter que le FGF ainsi que son récepteur doivent se dimériser pour induire une cascade de signalisation. Le FGF et son récepteur interagissent tout deux avec l'Hp ou les HS. Cette interaction les rapproche augmentant ainsi la probabilité de former un complexe capable d'induire la signalisation. Il a également été démontré que cette interaction stabilise et active le complexe (FGF-FGFR)₂. L'HS agit dans cette situation en tant que co-récepteur de la signalisation des FGF [256].

L'implication de l'Hp ou des HS dans la formation du complexe entre FGF et FGFR est le début d'une grande controverse, encore persistante aujourd'hui. L'obtention de deux structures cristallographiques différentes a fait naître deux modèles d'interaction, illustrés sur la figure 32.

Dans le modèle de Schlessinger [257], il a été proposé que le site d'interaction des HS est formé par un sillon basique dans l'interface du complexe (FGF-FGFR)₂. L'HS stabilise le complexe FGF-FGFR en formant un complexe 2:2:2 (FGF:FGFR:HS)₂, mais les contacts protéine-protéine restent primordiales.

D'autre part, un modèle asymétrique est proposé par Pellegrini [258] dans lequel un complexe (FGF:FGFR)₂:HS 2:2:1 est formé. Le FGF-FGFR pré-associé se dimérise grâce à l'interaction avec une même chaîne d'HS. Dans ce modèle, le FGF et son récepteur interagissent avec une même chaîne d'HS qui maintient les deux FGF:FGFR ensemble. Dans ce cas, c'est l'HS qui est primordial pour la dimérisation du FGF:FGFR. Cependant il est important de mentionner que dans les deux modèles le type de FGF et de FGFR cristallisés ne sont pas les mêmes. Il est donc pertinent de postuler que différents modes de signalisation existent.

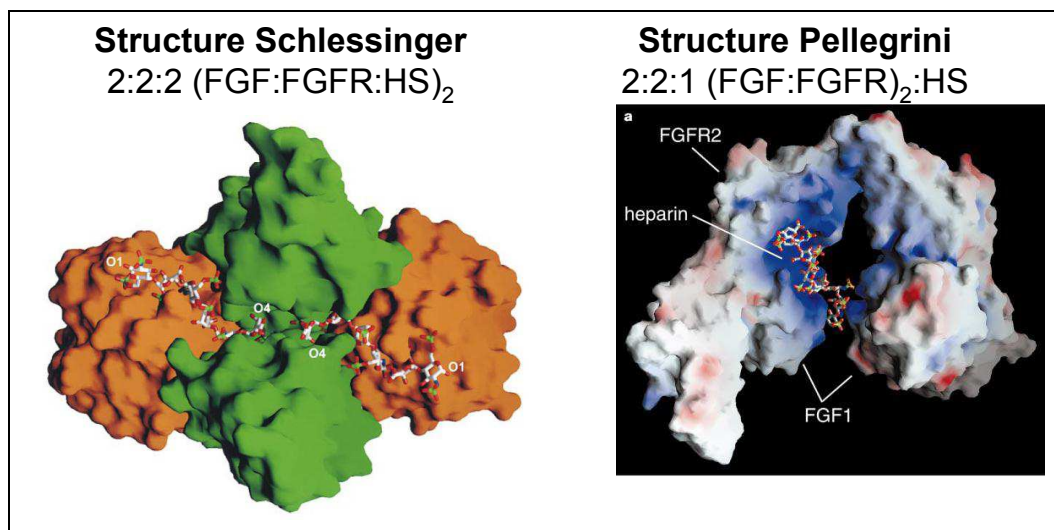


Figure 32 : Comparaison des structures du complexe FGF:FGFR:HS.

A gauche, structure du complexe FGF2:FGFR1-Hp avec une stœchiométrie 2:2:2. FGF2 est illustrée en orange et son récepteur en vert, l'Hp (un décasaccharide) en modèle bâton. FGF et FGFR sont maintenus ensemble majoritairement par leur interaction réciproque avec l'Hp. **A droite, la structure du complexe FGF1:FGFR2:Hp avec une stœchiométrie 2:2:1.** Modèle de la surface électrostatique du complexe FGF-FGFR avec en bleu les régions basiques. Le fragment d'Hp, un décasaccharide, est illustré en modèle bâton. FGF et FGFR sont dans ce modèle majoritairement maintenus ensemble par des contacts entre eux.

D'après schlessinger *et al.*, 2000 [257] et Pellegrini *et al.*, 2000 [258].

III.1.e. Les HS sont impliqués dans l'adhésion cellulaire

La MEC joue un rôle essentiel dans le soutien structural des cellules *via* la formation d'un réseau entre ses différents composants. Dans ce contexte, les HS aident à la formation du maillage de cette MEC en interagissant avec les composants majeurs de cette dernière tels que la laminine, la fibronectine et le collagène [259]. De plus, les cellules adhèrent directement à la MEC par le biais d'interaction entre intégrines et MEC mais aussi *via* des interactions entre

les HS des cellules et des composants de la MEC, comme la laminine [260-261]. Les HS renforce ainsi l'adhésion cellules-matrices [262].

D'autre part, les HS promeuvent l'adhésion cellulaire par la stabilisation d'interactions intercellulaire. En effet les HS des syndécans interagissent avec des molécules d'adhésion cellulaire, comme par exemple L-sélectine et PECAM-1 des cellules adjacentes. De cette manière, ils stabilisent et augmentent l'affinité des contacts intercellulaires déjà établis [197].

III.1.f. Les HS protègent et activent les protéines

SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) est une chimiokine qui interagit à la fois avec les HS et avec un récepteur couplé aux protéines G. Dans certaines cellules, SDF-1 est inactivé par une protéase spécifique, CD26/dipeptidyl peptidase IV, qui enlève son dipeptide N-terminal. Sadir *et al.* ont démontré que l'interaction avec les HS protège SDF-1 de cette protéolyse spécifique (figure 33) [263].

Dans l'interaction de l'IFN γ avec les HS, il a été démontré que le rôle des HS est multiple. En premier lieu, les HS protègent une partie de l'IFN γ contre la protéolyse. Cette protection partielle génère la formation d'une forme plus active de l'IFN γ . De ce fait, les HS augmentent également la signalisation de l'IFN γ . Plus d'informations seront données dans le paragraphe III.5.b.

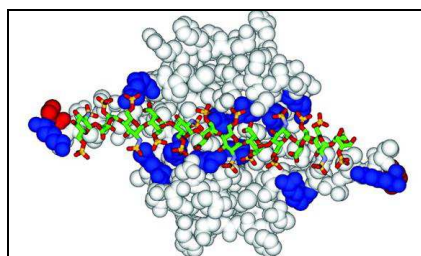


Figure 33 : Modèle d'interaction entre SDF-1 et un dodécasaccharides d'HS.

Les résidus basiques impliqués dans l'interaction avec les HS sont illustrés en bleu, la proline-2 (site de coupure par CD26) en rouge et l'oligosaccharide en modèle bâton. L'interaction de SDF-1 avec des oligosaccharides protège la chimiokine contre la protéolyse par CD26/dipeptidyl peptidase IV.

D'après Sadir *et al.*, 2004 [263].

III.1.g. Les HS stockent et relâchent des protéines

Il est clair, au vue des exemples présentés dans les paragraphes précédents, que les HS interagissent avec de nombreuses protéines qui sont, de cette façon, immobilisées pour un certain temps sur la surface cellulaire, dans la MEC ou dans des granules de sécrétion.

Les FGF sont notamment retenus, stabilisés et protégés par l'interaction avec les HS présents sur la surface cellulaire. Dans l'angiogenèse, après un stimulus approprié, des héparanases sont sécrétées et coupent les chaînes d'HS de la surface cellulaire. Ils libèrent ainsi les FGF qui y sont associés [264]. D'autre part, dans l'activation des neutrophiles, certaines protéases, comme l'élastase et la cathepsine, sont libérées dans le milieu extracellulaire où elles dégradent les HSPG et libèrent des facteurs de croissance, telle que TGF- β . Cette libération est associée aux maladies caractérisées par une prolifération excessive des fibroblastes comme certaines maladies pulmonaires comme la broncho-pneumopathie chronique obstructive [265-266].

III.1.h. Les HS sont également exploités par des pathogènes

Les pathogènes corrompent leurs hôtes afin de promouvoir leur virulence et leur prolifération. Les HS sont utilisés par des pathogènes très divers, incluant des bactéries, des virus et des parasites, afin de cibler les cellules hôtes ou d'esquiver leurs mécanismes de défense (figure 34) [267].

Le virus *herpes simplex* est un des premiers virus pour lequel le rôle des HS fût élucidé. L'entrée virale débute par un attachement des glycoprotéines virales aux HS. Ce contact initial n'est par contre pas suffisant pour l'entrée virale. En effet, pour cela la glycoprotéine gD doit interagir avec son récepteur spécifique. L'utilisation des HS comme site d'interaction initial est également exploité par le virus de l'hépatite B, dans lequel le domaine preS de la protéine de l'enveloppe du virus s'attache aux HS, et par le *papillomavirus* humain via la protéine de la capsid L1. Un tel rôle est également supposé pour le virus de l'immunodéficience humaine [267-268].

Dans certains cas les HS peuvent induire directement l'endocytose des virus comme dans un mutant des *rhinovirus* ou pour la fièvre aphteuse non virulente.

Des bactéries, gram négatif ainsi que positif, utilisent ce même procédé pour l'attachement, l'entrée et l'échappement aux mécanismes de défense de l'hôte [268]. *Neisseria gonorrhoeae* utilise les HS comme site initiale d'attachement. *Streptococcus agalactiae* les utilise pour médier l'entrée d'une protéine (la protéine alpha C) de la bactérie dans les cellules de l'hôte [269]. D'autre part, certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, induisent le « shedding » des ectodomains de syndécan-1. Le rôle exact de l'induction de ce « shedding » n'est pas complètement connu, mais il semblerait qu'il augmente fortement la virulence [270-271].

Nombreux sont également les parasites, comme *leishmania* et *toxoplasma gondii*, qui exploitent la présence des HS sur les surfaces cellulaires de leur hôte [268].

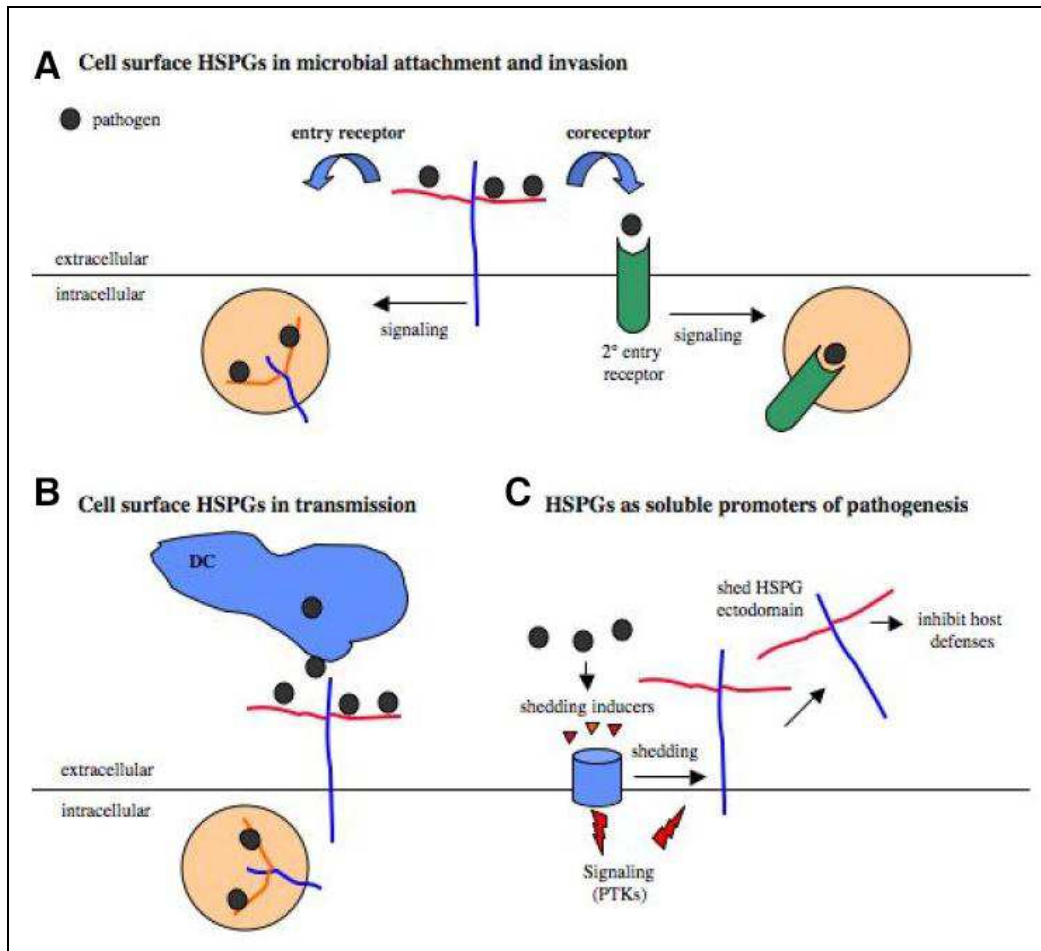


Figure 34 : Les pathogènes exploitent les HS sur la surface cellulaire de leur hôte.

A. Les HS sont utilisés comme récepteur ou site d'attachement par de nombreux virus, parasites et bactéries. B. Les HS peuvent également retenir des particules virales et ainsi induire la transmission virale. C. Certaines bactéries induisent le « shedding » des HSPG, le rôle de ce mécanisme n'est pas encore totalement compris. PTK signifie l'activité de la protéine tyrosine kinase.

D'après Chen *et al.*, 2008 [268].

III.2. Méthodes de caractérisation de l'interaction

A cause de la variabilité structurale excessive des HS, l'analyse de leur structure et des séquences liant des protéines est extrêmement difficile. En effet 48 disaccharides différents sont en théorie possible. Si le site d'interaction comporte 4 disaccharides, alors 48^4 (plus de 5 millions) oligosaccharides différents sont générés. Les techniques d'analyses disponibles ont considérablement évolué ces dernières années, chacune avec ses avantages et inconvénients mais une comparaison des différentes techniques est obligatoire pour définir le site

d'interaction d'une protéine. Seule une liste non exhaustive de quelques techniques clés sera présentée dans les paragraphes III.2.a à III.2.d.

III.2.a. *Les méthodes biochimiques*

Dans un premier temps, afin d'identifier une interaction observée entre une protéine et les HS ou l'Hp - utilisée en tant qu'analogue des sites d'interaction des HS -, la chromatographie d'affinité sur colonne d'Hp peut être employée. La quantité de sel nécessaire pour éluier la protéine donne une idée de l'affinité entre la protéine et l'Hp. Si la concentration de sel est supérieure à la concentration de sel physiologique, l'interaction peut être biologiquement pertinente. Les mutations de certains résidus susceptibles d'être impliqués dans le site d'interaction aux HS, devrait diminuer la concentration de sel nécessaire pour éluier la protéine, si en effet ces résidus sont importants dans l'interaction. Cette méthode est rapide et peu coûteuse. Cependant, elle ne mesure pas directement la constante d'affinité mais la quantité de sel nécessaire pour interrompre des interactions électrostatiques entre l'Hp immobilisée et les protéines. Ainsi, les épitopes identifiés peuvent être biaisés du fait de leur charge qui influence les interactions électrostatiques sans pour autant interagir avec l'Hp de façon spécifique [272-273].

Une méthode plus précise est la compétition à l'équilibre. Le ligand, l'Hp ou l'HS, est immobilisé avant d'être pré-incubé avec la protéine radiomarquée. Puis, l'Hp soluble est apportée en quantité croissante avant de mesurer la quantité de protéines relarguées. L'inverse, où la protéine est immobilisée, est également possible. Cette méthode a l'inconvénient d'utiliser des ligands radiomarqués, mais la détermination de l'IC₅₀ et de la constante d'affinité est possible. L'oligomérisation des protéines, lorsqu'elles lient l'Hp, est également observable. La mesure directe de l'interaction entre une protéine immobilisée et l'Hp tritiée est possible mais souvent moins précise que la mesure de la compétition [274]. L'avantage de l'HS tritié est qu'il peut être marqué de façon métabolique et donc provenir de cellules différentes. On peut de cette façon étudier les HS provenant de tissus différents [275]. L'approche par ELISA fut difficile à mettre en place, du fait de la faible fixation de l'Hp ou des HS aux plaques de titrations conventionnelles. Ceci n'est plus le cas aujourd'hui du fait de l'arrivée sur le marché des plaques EpranEx®. Ces plaques ont un revêtement spécifique liant les différents GAG dont l'Hp ou les HS. La fixation des protéines sur l'Hp/HS immobilisé est mesurable avec des anticorps primaires spécifiques. Cette méthode n'utilise pas beaucoup de matériel et ne nécessite aucun marquage préalable [276].

De plus, les sites d'interaction entre la protéine et les HS peuvent être identifiés. Des analyses de « footprinting protéolytique », de perturbation des déplacements chimiques et de mutagenèse ponctuelle permettent d'identifier le site d'interaction sur la protéine. Si l'on souhaite analyser le site d'interaction sur les HS, de nombreuses méthodes sont à disposition. Elles seront expliquées en détail dans la partie « résultats » qui concerne l'identification du site d'interaction des HS pour l'interaction avec l'IFN γ .

III.2.b. *Les techniques ex vivo (sur cellules en culture)*

La preuve ultime que l'interaction entre une protéine et des HS, préalablement identifiée par des techniques biochimiques, est biologiquement pertinente, est l'identification de l'interaction sur des cellules en culture, voir même *in vivo*. Différentes stratégies peuvent être utilisées. Soit, la visualisation de la fixation de la protéine sur les cellules en absence et présence des HS [277]. Cette méthode nécessite soit un moyen de visualisation de la protéine lorsqu'elle interagit avec les HS, notamment par la fluorescence ou par l'utilisation d'une protéine radiomarquée, soit, une mesure du changement de l'activité en absence ou présence d'HS, si les HS sont essentiels pour l'activité de la protéine [278]. Afin de pouvoir employer cette technique, le rôle de l'interaction de la protéine avec les HS doit être connu et des protocoles de mesure d'activité mis au point.

III.2.c. *Les approches biophysiques*

Au travers des approches biophysiques, la formation du complexe protéine:HS et ses propriétés thermodynamiques, cinétiques etc. peuvent être déduites. Elles révèlent des caractéristiques essentielles pour la compréhension du mécanisme de la formation de ce complexe et de ses fonctions physiologiques.

Si la protéine contient un tryptophane, la technique la plus simple à mettre en œuvre pour confirmer l'interaction et analyser la constante d'affinité, est la titration isothermale de fluorescence. En effet, aucun marquage de la protéine ni des HS n'est nécessaire. Lorsque la protéine interagit avec les HS, une différence d'intensité de la fluorescence intrinsèque peut être observée [279]. Si la protéine ne contient pas de tryptophane, la mutagenèse d'une phenylalanine ou tyrosine en tryptophane est envisageable. D'autres techniques, comme le « thermal shift assay » et le dichroïsme circulaire peuvent également caractériser une interaction entre la protéine et des HS, ce dernier permettant même l'analyse des changements

de structure secondaire de la protéine lorsqu'elle forme le complexe. Cependant, pour le dichroïsme circulaire, un changement de structure secondaire lors de la formation du complexe est nécessaire. En effet, si la structure secondaire de la protéine n'est pas changée lors de son interaction avec les HS, aucune différence en signaux ne sera observée mais une interaction avec les HS peut quand même avoir lieu. De la même façon, pour le « thermal shift assay » si l'interaction de la protéine avec les HS ne stabilise pas la protéine aucun signal ne sera observé. [280].

D'autre part, la résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique puissante pour mesurer l'affinité entre une protéine et l'HS ainsi que leur vitesse d'association et de dissociation. Pour cette technique, un des partenaires doit être immobilisé sur une surface spécifique. Dans le plupart des cas, l'Hp ou les HS est immobilisé. Cette immobilisation ne devrait pas altérer l'interaction avec la protéine car les HS sont attachés à la surface cellulaire, leur immobilisation imitent donc la réalité cellulaire [80]. Dans la partie « résultats » le fonctionnement de la SPR sera plus amplement expliqué.

La titration calorimétrique isothermale (ITC) offre des informations sur des paramètres thermodynamiques ainsi que sur la constante d'affinité et sur la stœchiométrie [280-281]. Ce point sera plus amplement illustré dans la partie « résultats ».

Enfin, la spectrométrie de masse (MS) est une méthode puissante permettant d'obtenir la masse d'un complexe protéine-GAG mais également la structure des oligosaccharides (lorsque leur taille est limitée). Auparavant, les problèmes d'ionisation de l'échantillon et de perte de groupement sulfate associés à l'ionisation limitaient son utilisation. De nouvelles méthodes d'ionisation et des matrices spécifiques permettent désormais une analyse rapide, exigeant très peu de protéines et/ou d'HS. Très souvent, la MS est employée couplée aux méthodes plus classiques notamment l'électrophorèse capillaire (CE). La masse du complexe ainsi que celle de la protéine ou de l'oligosaccharide séparé peuvent être déterminée de cette façon [282-285].

III.2.d. L'élucidation de la structure du complexe

La reconnaissance des protéines par des HS dépend de leurs caractéristiques structurales. La méthode la plus directe pour caractériser les interactions est la visualisation du complexe au niveau moléculaire ou atomique.

Des méthodes à basse résolution permettent la caractérisation de leur rayon hydrodynamique. L'ultracentrifugation et la chromatographie d'exclusion donnent une idée de la taille du complexe et caractérisent une oligomérisation éventuelle [40, 286].

La difficulté majeure concernant les autres méthodes d'analyse structurale est la taille et la diversité des HS. Pour cette raison, dans ces études, des oligosaccharides de préférence homogènes et de taille limitée sont utilisés à la place des chaînes d'HS ou d'Hp entières. Les très petits oligosaccharides peuvent être obtenus homogènes par purification à partir de source naturelle. Cependant pour ceux de taille supérieure, l'obtention par synthèse chimique est nécessaire de manière à avoir un oligosaccharide parfaitement homogène. La synthèse chimique est très laborieuse mais permet néanmoins l'obtention d'oligosaccharides parfaitement définis et de taille limitée [287]. D'autre part, la modification chimio-enzymatique d'héparosan, analogue non sulfaté et non épimérisé d'HS, représente une alternative intéressante [288].

La structure d'un complexe peut être obtenue par spectrométrie au RMN. Cependant, le marquage en ^{13}C et en ^{15}N est nécessaire pour visualiser ligand et protéine. De plus, seule la structure des protéines avec une masse moléculaire pas trop élevée peut être déterminée [289-290]. Une alternative est la détermination de la structure par cristallographie aux rayons X. Ceci est par contre un réel défi car pour obtenir un cristal l'échantillon doit être parfaitement homogène. Ceci est particulièrement difficile dans les cas des complexes protéines:HS. Ce point sera plus amplement détaillé dans la partie « résultats ». Ce n'est d'ailleurs qu'en 1997 que la première structure d'un complexe protéine:oligosaccharide a été obtenue, celle du complexe entre l'ATIII et un oligosaccharide synthétique [291]. Aujourd'hui, seuls des complexes entre une protéine et des oligosaccharides de taille très limitée ont été cristallisés et leur structure obtenue. La nature et la structure de l'interaction peuvent de cette façon être analysées.

En complément des méthodes précédentes ou en l'absence d'autres méthodes, les approches de modélisation moléculaire peuvent permettre d'obtenir des indications sur le site d'interaction et sur la structure possible du complexe. Par contre, la flexibilité des chaînes latérales des AA et des oligosaccharides augmentent la complexité de l'analyse du fait des nombreuses conformations possibles. Des programmes de prédiction de plus en plus performants permettent désormais l'identification de certains résidus clés intervenant dans l'interaction avec les HS et de proposer ainsi un modèle du complexe [237, 239, 292].

III.3. Différents degrés de spécificité d'interaction

III.3.a. Antithrombine III : liant une séquence d'HS strict

L'héparine a été découverte du fait de sa capacité à lier et à activer l'antithrombine III (ATIII), elle la transforme ainsi en un anti-coagulant puissant [293]. Son rôle en tant qu'activateur de l'ATIII a déjà été développé dans le paragraphe III.1.a. Dans ce paragraphe nous allons examiner plus spécifiquement la séquence des HS liant la protéine.

Les analyses structurales, identifiant le site d'interaction des HS avec l'ATIII, n'ont débuté qu'au milieu des années 70 lorsque les scientifiques ont pris conscience que l'Hp ou les HS ne sont pas des homopolymères mais des molécules dotées de structures particulières. A partir de 1976, deux études indépendantes ont démontrées que seule une partie de l'Hp était capable de se complexer avec l'ATIII. De nombreuses études ont essayé par la suite d'identifier l'oligosaccharide liant l'ATIII avec une haute affinité (celui qui provoque son activation) [294-295]. Entre 1978 et 1983, différentes études élucidèrent peu à peu la structure du site d'interaction mais la découverte clé fût l'identification d'un groupement 3-O-sulfate nécessaire à l'interaction [213]. Les analyses par RMN, mais également des analyses biochimiques classiques, démontrent qu'un pentasaccharide spécifique provoque la haute affinité pour l'ATIII [296-297]. La preuve ultime, que cette séquence obtenue par dépolymérisation d'Hp, est effectivement le site d'interaction pour l'ATIII, fût apportée par la mesure de l'affinité entre l'ATIII et ce pentasaccharide obtenu par synthèse chimique [298]. La structure du complexe entre l'ATIII et ce pentasaccharide a également été résolue par cristallographie aux rayons X (figure 35.b). Ces résultats montrent l'existence de deux sites de fixation distincts sur la protéine, composés des résidus K114, K125 et R129 pour le premier, et des résidus R46 et R47 pour le second. Du côté du sucre, les monosaccharides 1-3 (figure 35a) fixent tout d'abord l'AT-III et induisent le changement conformationnel qui est alors stabilisé par l'interaction avec le disaccharide 4-5, l'acide iduronique en position 4 adopte alors une conformation de type ³S₀ [291]. Le pentasaccharide interagit avec l'ATIII par le groupement N-sulfate de la GlcNS (1), le groupement 6-carboxyle du GlcA (2), les groupements N- et 3-sulfates de la GlcNS (3), le groupement 6-carboxyle de l'IdoA (4) et le groupement 6-sulfate du GlcNS (5).

Une telle spécificité du site d'interaction des HS pour l'ATIII est exploitée pour la conception d'un médicament anticoagulant. Celui-ci est basé sur le pentasaccharide liant spécifiquement l'ATIII avec une haute affinité.

L'intérêt d'identifier des oligosaccharides liant des protéines spécifiques n'a pas cessé depuis cette date. En revanche, une telle spécificité d'interaction où un oligosaccharide unique lie une protéine particulière n'a pas encore été démontrée. Cependant, l'importance des groupements 3-O-sulfate, modification rare des HS, a également été constatée pour l'attachement de la glycoprotéine D du virus de l'herpès [299] et de la cyclophilin B [300].

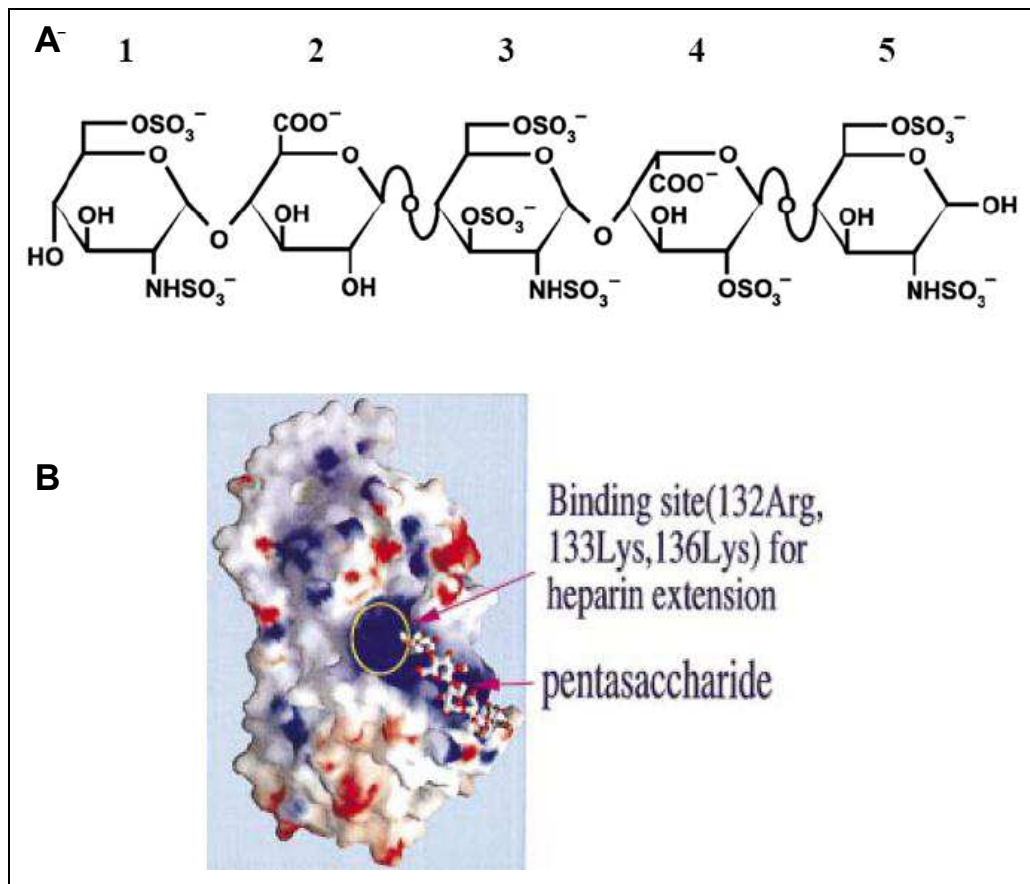


Figure 35 : Structure du site d'interaction entre l'ATIII et le pentasaccharide.

A. Séquence du pentasaccharide liant l'ATIII à haute affinité. B. Surface électrostatique de l'ATIII en complexe avec le pentasaccharide. En rouge, potentiel négatif et en bleu potentiel positif. Il est évident que le pentasaccharide, hautement négativement chargé, interagit avec un sillon basique de la protéine. Le pentasaccharide est illustré par un modèle bâton.

D'après Jin *et al.*, 1997 [291].

III.3.b. FGF : l'importance de certains groupements sulfates

A la suite de l'élucidation du rôle des HS comme co-récepteur de FGF-1 et 2 et l'identification du pentasaccharide liant l'ATIII, le site d'interaction des HS pour FGF-1 et 2 a été étudié par de nombreux groupes. Ces analyses étaient très contradictoires au début, sûrement dû au fait que le site d'interaction ne liait pas un oligosaccharide particulier. En ainsi, il a été démontré que le site minimum liant le FGF-1 est un hexasaccharide et un décasaccharide pour FGF-2. Dans les deux cas, certains groupements 6-O-sulfate spécifiques

semblent plus importants que d'autres pour l'interaction, comme illustré sur la figure 36. On aurait pu imaginer que c'est uniquement l'augmentation de la charge globale (par l'augmentation du taux de 6-O-sulfatation) qui accroît l'affinité. Mais ceci ne semble pas le cas puisque l'activité des espèces aux taux de sulfatation relativement proche s'avère très différente en comparaison de leur capacité à induire l'activation de FGF-1 et 2 [301-302]. Une même analyse avec d'autres FGF démontre seule l'importance de certains groupements sulfates. Par exemple, concernant l'interaction avec les HS, FGF-10 nécessite des groupements 6-O-sulfate tandis que FGF-4 nécessite aussi bien les groupements 2- que les 6-O-sulfate [303].

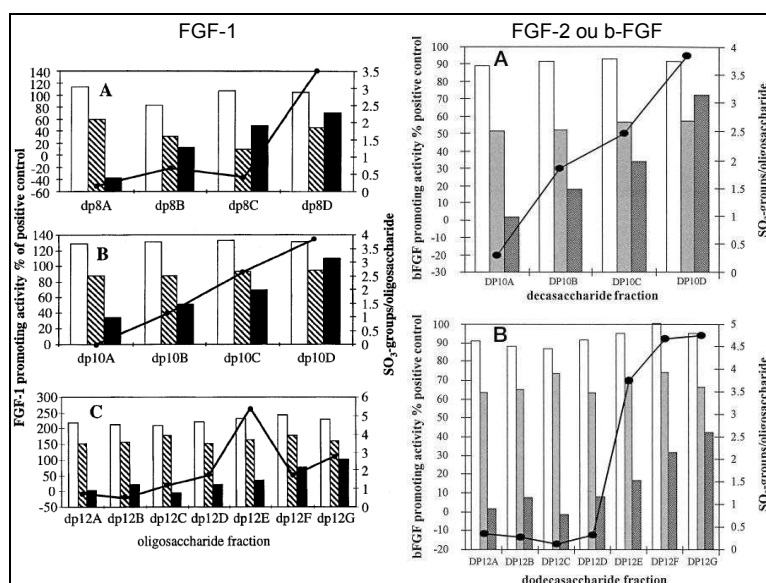


Figure 36 : Importance des groupements 6-O-sulfate dans l'interaction des HS avec FGF-1 et FGF-2.

L'augmentation d'activité proliférative spécifique de FGF-1 et de FGF-2 (ici appelé bFGF) est mesurée pour différents oligosaccharides avec leur taux de N-sulfatation (barre vide), de 2-O-sulfatation (barre hachurée) et de 6-O-sulfatation (barre noire). La courbe démontre l'activité anti-proliférative du FGF-1 mesurée. Pour FGF-1, une importance des groupements 6-O-sulfate spécifiques est observée car une augmentation des groupements 6-O-sulfate dans les décasaccharides augmentent l'activité des FGF-1. Cependant, il est fortement supposé que ce sont des groupements 6-O-sulfate spécifiques qui interagissent avec FGF-1 car l'activité entre fraction dp12E et dp12F diminue malgré une légère augmentation du taux de 6-O-sulfatation. Des résultats similaires sont obtenus avec FGF-2

D'après Pye *et al.*, 1998 et Pye *et al.*, 2000 [301-302].

Ce modèle d'interaction, comportant un motif d'interaction minimal mais tolérant une variabilité, témoigne d'un autre mécanisme d'interaction protéine:HS moins strict que celui élucidée pour l'ATIII. Nous supposons alors que les différentes structures d'HS exprimées interagissent différemment avec les protéines.

III.3.c. *L'utilisation de multiples domaines NS*

Lorsque deux sites d'interaction pour les HS sont présents dans la protéine, notamment quand il s'agit d'une protéine homodimérique, il est possible que la protéine lie deux domaines d'interaction de type NS d'une même chaîne d'HS. Ce modèle d'interaction spécifique a pour la première fois été mis en avant dans le cas de l'interaction de l'IFN γ avec l'HS [304], ce modèle sera amplement détaillé dans le paragraphe III.5. D'autres protéines avec un tel site d'interaction sont maintenant connues, en voici deux exemples :

Une variante du VEGF - VEGF-A₁₆₅ -, interagit avec les HS afin d'activer de façon optimale sa cascade de signalisation. VEGF-A₁₆₅ est un homodimère maintenu par des ponts disulfures. Les analyses structurales identifiant les caractéristiques importantes pour la liaison des HS incluent un oligosaccharide avec 6 à 7 résidus minimum interagissant avec chaque monomère. Il a été postulé que ces deux domaines NS interagissant avec la protéine sont reliés par une séquence de transition (de type NA/NS ou NA) [305]. Ce modèle d'interaction ressemble très fortement à celui de l'IFN γ .

L'IL8, est une chimiokine retenue par les HS afin de former un gradient. L'interaction de seul un monomère de la protéine avec l'Hp est trop faible pour être physiologiquement relevante. Par contre, l'interaction de l'Hp avec le dimère de l'IL8 augmente considérablement son affinité. Ainsi, il a été démontré que le site d'interaction est composé de deux hexasaccharides de type domaines NS, maintenus à une certaine distance grâce à un domaine de liaison de 14 monosaccharides de type NA [306]. D'autres modèles d'interaction ont également été proposés pour l'IL8.

L'implication d'un site d'interaction de type NS-NA-NS est également retrouvé chez MIP- α , endostatine et RANTES [249, 307-308]. La structure d'un tel site d'interaction complique encore les notions de spécificité d'interaction entre les protéines et les HS : non seulement les positions des groupements sulfates et des sites d'épimérisation des HS sont importants mais également la taille des domaines NS et celle des domaines espaceurs sont essentielles pour assurer la haute affinité entre la protéine et les HS [186].

III.3.d. *Les protéines lient des séquences a priori aléatoires*

L'interaction entre le PF-4 (platelet factor 4) ou la fibronectine et l'Hp/HS semble uniquement basée sur un taux de sulfatation et non sur les positions de groupements sulfates spécifiques. En effet, l'affinité de la protéine pour les HS/Hp augmente de façon proportionnelle avec la charge de l'Hp ou des HS [309]. Est-il alors possible qu'aucune spécificité du site d'interaction des HS ne soit pré-requise pour l'interaction avec certaines protéines [310-311] ? C'est le cas pour de nombreuses protéines liant les HS, ce qui n'exclut pas l'existence de motifs préférentiels, mais qui restent non déterminés à ce jour.

III.4. Quelle ampleur de spécificité d'interaction entre protéine et HS ?

La structure fine des HS semble être la base de l'interaction avec des protéines. Pourtant pendant longtemps seules des interactions électrostatiques non spécifiques entre protéines et l'HS ont été postulées. Aujourd'hui, ces interactions paraissent plus spécifiques qu'initialement observées, du moins pour quelques cas. Pourrait-on cependant pour autant conclure que ces structures particulières liant des protéines sont produites de façon non aléatoire par la cellule. Cette hypothèse reste très difficile à vérifier.

Premièrement, la biosynthèse des HS, décrite en paragraphe II.4 n'est pas codée comme postule le dogme central de la production des protéines. Est-ce que la biosynthèse des HS est alors réellement régulée ? Ou est-ce que la présence d'une séquence d'HS particulière à la surface cellulaire est le résultat d'une accumulation de différentes structures parmi lesquelles se trouve par hasard celle recherchée ? Peut-être la situation n'est-elle pas aussi contrastée. L'expression tissu-spécifique de certaines enzymes de modification et la possibilité qu'elles interagissent entre elles, comme l'indique l'hypothèse du « Gagosome », pourraient bien augmenter la probabilité de retrouver une séquence particulière. Sans que ces différentes structures d'HS soient pour autant inscrite dans le génome [186, 310, 312].

De plus, est-ce que les protéines lient des séquences réellement spécifiques ? Malgré les difficultés d'indentification des sites d'interaction protéine:HS, pour quelques protéines ceux-ci sont désormais bien connus. Ces résultats montrent qu'effectivement pour certaines protéines un oligosaccharide bien défini est nécessaire pour l'association avec une protéine, comme dans le cas de l'antithrombine III [310, 313]. Par contre, dans d'autres cas, seuls des motifs minimaux d'HS semblent nécessaires pour l'interaction avec la protéine tolérant une variabilité de cette séquence, comme dans le cas de FGF-1 [301].

La spécificité d'interaction entre les diverses protéines et les HS reste aujourd'hui encore source de polémique. Seule l'élucidation d'autres sites d'interaction et de leurs actions biologiques pourraient éclaircir ce débat. Cette réflexion nous mène directement dans le cœur du sujet de thèse pendant lequel nous avons cherché à identifier le site d'interaction de l'IFN γ sur les HS.

III.5. L'interaction de l'IFN γ avec les HS

Depuis le début des années 90 le nombre d'études concernant l'interaction entre les protéines et les HS a explosé. En effet, à cette époque la séquence spécifique des HS liant l'ATIII est élucidée et l'importance des HS en tant que corécepteur pour le FGF-2 fût mis en évidence [254-255, 296-297]. Ces deux études démontrent l'intérêt croissant que les chercheurs portaient au sujet des HS [287-288].

III.5.a. Identification des HS comme ligand de l'IFN γ

C'est également à cette époque que l'interaction entre l'IFN γ et les HS fût découverte [314]. L'IFN γ et les HS interagissent à haute affinité ($K_D = 1.5$ nM) [314], ceci est du même ordre de grandeur que l'affinité observée pour l'IFN γ et son récepteur ($K_D = 0.68$ nM) [80]. Malgré une étude qui indique que les CS interagissent également avec l'IFN γ [315], des tests d'activité et d'inhibition de l'interaction IFN γ :HS identifient seuls les HS et l'Hp comme principal ligand oligosaccharidique de l'IFN γ [316-317]. Il est cependant possible qu'une interaction non physiologique ait été observée dans cette étude où les CS lient l'IFN γ par des interactions non spécifiques [315, 317]. En revanche l'interaction avec les HS ne semble pas uniquement basée sur des interactions électrostatiques, car l'affinité mesurée est plus haute que celle de FGF-2 pour les HS malgré un pI de l'IFN γ plus bas que celui du FGF-2 [318].

- **Site d'interaction de l'IFN γ pour les HS**

Du fait que les HS soient hautement chargés négativement, la partie C-terminale de l'IFN γ , contenant deux domaines basiques - D1 et D2-, est de suite ciblée en tant que site d'interaction possible. L'utilisation d'AcM spécifiques dirigés contre le peptide C-terminal, de peptides synthétiques de l'extrémité C-terminale de l'IFN γ et de formes tronquées de l'IFN γ a permis de confirmer l'hypothèse que ce domaine C-terminal de l'IFN γ est le domaine d'interaction pour les HS [87, 314, 317]. De plus le domaine basique D1 semble plus important que le domaine D2 dans cette interaction. En effet, des peptides synthétiques

contenant le domaine D1 inhibent plus l'interaction avec les HS que ceux contenant le domaine D2 [87]. Cette plus forte interaction avec le domaine D1 semble protéger ce domaine de la dégradation protéolytique (voir également paragraphe I.6). Cependant, l'interaction de l'IFN γ avec les HS ne change pas la structure des deux partenaires [40, 319].

- **Site d'interaction des HS pour l'IFN γ**

Du fait que les interactions électrostatiques soient à la base de l'interaction de l'IFN γ avec les HS, il n'est pas étonnant que la présence des groupements sulfates soit primordiale pour cette interaction [316-317]. Une vision plus concrète du site d'interaction est obtenue grâce à des expériences de « footprinting », représenté sur la figure 37. La structure du site d'interaction s'avère particulière : elle est composée de deux domaines type NS de 6 à 8 saccharides reliés entre eux par un domaine de type NA de 15 à 16 disaccharides. De plus, des expériences de pontage covalent entre l'IFN γ et HS démontrent qu'une molécule d'HS se lie à un dimère d'IFN γ . Un modèle d'interaction est alors proposé basé sur la connaissance du site d'interaction des HS et le repliement symétrique de l'IFN γ [304]. Par ailleurs, ce modèle permettra d'expliquer la grande différence en affinité observée pour l'interaction de l'IFN γ avec des octasaccharides (faible affinité) ou avec des fragments d'Hp d'au moins 10 kDa (affinité nettement plus élevée). En 1995, l'identification d'un tel site d'interaction était une première [304]. Une question sur ce modèle d'interaction reste désormais en suspens : comment expliquer que la distance entre la base des deux parties C-terminales est de 20 Å alors que dans le modèle d'interaction les deux octa/hexasaccharides sont reliés par un domaine de 15-16 disaccharides avec une longueur de 262-280 Å ? Premièrement, il est possible que le domaine interne NA soit non-linéaire et donc plus court que sa distance étendue. Deuxièmement, il est fortement possible que dans les HS issus de fibroblastes (matériel utilisé pour cette étude) des domaines NA plus courts soient peu présents.

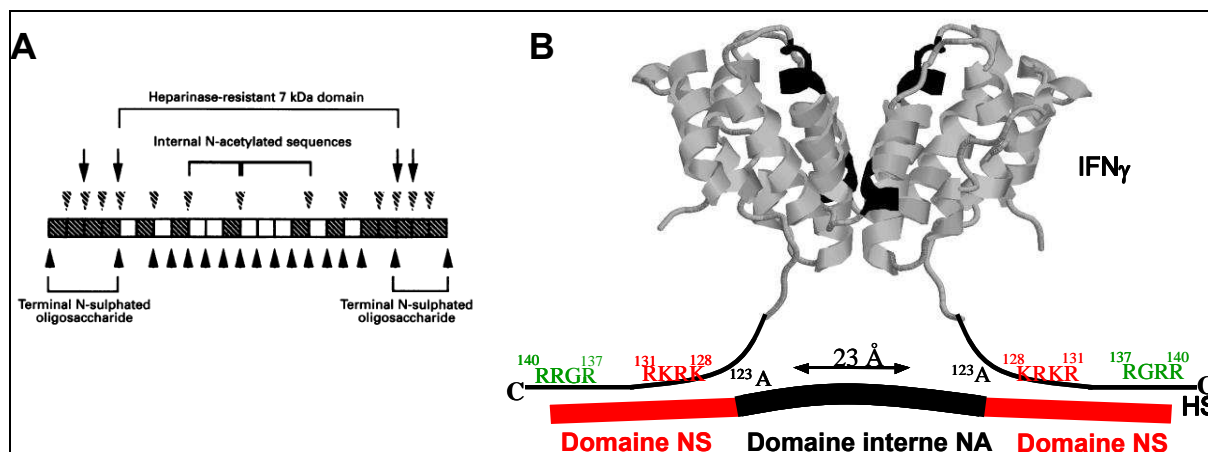


Figure 37 : Modèle du site d'interaction de l'HS pour IFN γ

A. Site d'interaction d'HS pour l'IFN γ proposé à partir d'expériences de « footprinting ». Les HS protégés par l'IFN γ sont soit séparés en taille soit digérés par l'héparinase (coupant les domaines NS) ou l'héparinitase (coupant les domaines NA). Ces expériences ont démontré que l'HS liant l'IFN γ avait une taille d'environ 10 kDa et contenait un domaine interne de type NA de 7 kDa entouré de deux domaines de type NS de 6 à 8 saccharides. **B. Model d'interaction entre IFN γ et HS proposé grâce aux interactions par « footprinting » et « crosslinking ».**

D'après Lortat-Jacob *et al.*, 1995 [304]

Un mime de ce site d'interaction est obtenu par synthèse chimique [320-321] (figure 38). Deux octasaccharides complètement sulfatés reliés entre eux par un bras espaceur de type PEG de 50 Å imitera de façon optimale le site d'interaction présent dans les HS. Effectivement ce mime lie l'IFN γ et inhibe ainsi l'interaction avec l'Hp ($IC_{50} = 35$ nM). Il inhibe également l'interaction avec l'IFN γ R. De ce fait ce mime rend l'IFN γ biologiquement inactif et il a donc un fort potentiel thérapeutique.

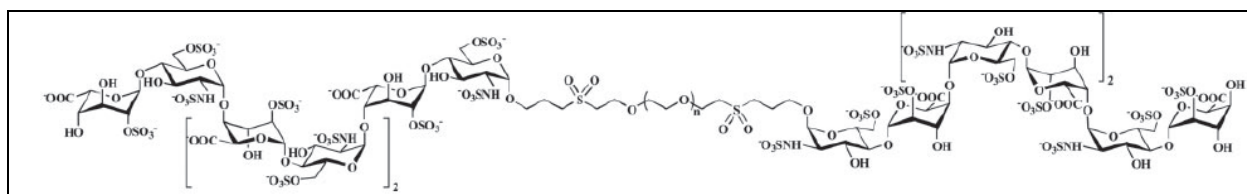


Figure 38 : Structure du mime du site d'interaction des HS pour l'IFN γ .

D'après Sarrazin *et al.*, 2005 [320]

III.5.b. Rôle physiologique de l'interaction IFN γ :HS

Différents rôles sont attribués à l'interaction de l'IFN γ avec les HS. D'abord, il a été observé qu'*in vivo* l'IFN γ est très rapidement éliminé du flux sanguin et concentré dans la MEC ou à la surface cellulaire. Cette élimination est fortement diminuée par pré-incubation de l'IFN γ avec de l'Hp soluble. Par conséquent, c'est l'interaction de l'IFN γ avec les HS qui concentre l'IFN γ à la surface cellulaire ou dans la MEC [277, 317, 322]. Chez le rat, une radiographie du foie, suite à une injection d'IFN γ radio-marqué, démontre que l'IFN γ n'est pas distribué de façon homogène mais concentré dans des zones particulières. Ces zones sont identifiées comme des régions à haute densité d'HS [323]. Ceci confirme que les HS localisent l'IFN γ à la surface cellulaire et que l'IFN γ semble être localisé de façon zone-spécifique selon le tissu (figure 39).

D'autre part, Sadir *et al.* [80] ont démontré que les HS ne servent pas de corécepteur de l'IFN γ car l'IFN γ ne peut pas à la fois lier les HS et l'IFN γ R. Une hypothèse est alors établie dans laquelle les HS concentrent l'IFN γ à la surface cellulaire puis le présentent aux IFN γ R. Ensuite, il a été observé que l'IFN γ injecté est rapidement dégradé au niveau de ses deux domaines basiques de la partie C-terminale lorsqu'il reste libre. Cependant, en complexe avec l'Hp, seul le domaine D2 est dégradé. Ainsi, les HS régulent la protéolyse partielle du domaine C-terminal de l'IFN γ [324].

Enfin, un mécanisme très particulier de régulation de l'activité de l'IFN γ par protéolyse partielle du peptide C-terminal de l'IFN γ fût découvert [79]. En effet, une perte de quelques résidus de ce domaine de l'IFN γ (maximum 10 AA) augmente son activité. En revanche, la suppression de résidus supplémentaires provoque la perte de toute son activité biologique. Etant donné que les HS protègent le domaine D1 de l'IFN γ contre les protéases, on peut supposer que les HS active l'IFN γ en limitant la protéolyse de son domaine C-terminal. La régulation de l'IFN γ par les HS est peut-être même plus complexe puisque l'ajout de l'Hp soluble inhibe la signalisation *via* IRF-1. Ce résultat est attendu puisque l'IFN γ complexé à l'Hp ne peut plus lier son récepteur. Cependant, il a été démontré que l'IFN γ complexé à l'Hp ne modifie pas la signalisation du gène *Nmi*. Ceci laisse supposer que l'interaction IFN γ :HS agit peut-être différemment sur des voies de signalisation distinctes [325], cependant aucune autre étude ne confirme ce résultat.

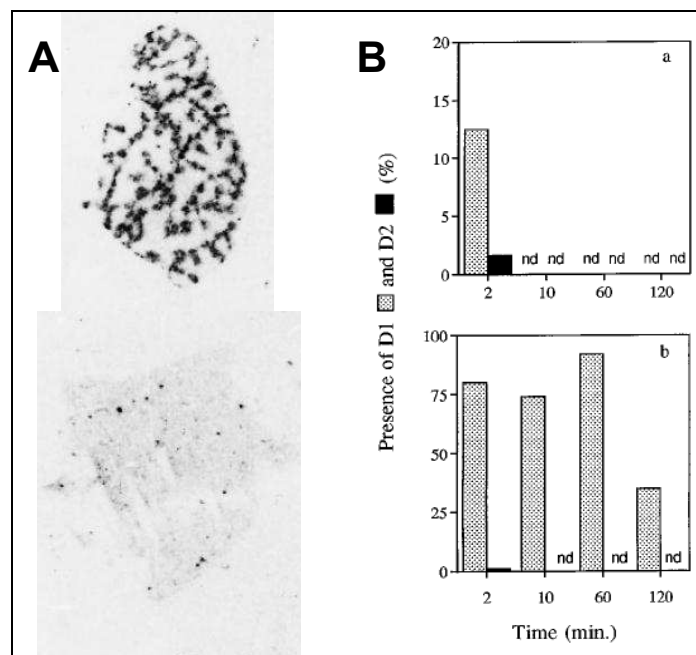


Figure 39 : L'Hp régule la protéolyse et la distribution tissulaire de l'IFN γ .

A. Distribution de l' ^{125}I - IFN γ 10 min après injection. Distribution de l'IFN γ injecté seul (dessus) ou co-incubé avec l'Hp (dessous) dans le foie, observée par autoradiographie. En absence de l'Hp l'IFN γ se concentre dans des régions très spécifiques dans le foie. Cependant, complexé avec de l'Hp, l'IFN γ ne se concentre plus dans le foie et reste dans le flux sanguin. Les taches noires démontrent la concentration de l'IFN γ . **B. Mesure de la dégradation du domaine C-terminal de l'IFN γ en présence ou absence d'Hp.** La présence des domaines D1 et D2 est identifiée par l'utilisation d'AcM spécifiques. Injection d'IFN γ recombinant seul (dessus) et en présence de l'Hp (dessous) chez de rat. En l'absence d'Hp, l'IFN γ est rapidement dégradé : 2 min après injection on assiste à une perte du domaine D2 et 10 min après on assiste à une perte des deux domaines basiques. En présence d'Hp, il y a uniquement perte du domaine D2, rapidement après injection. Par contre l'héparine protège le domaine D1 contre la protéolyse.

D'après Lortat-jacob *et al.* [277], 1996 et Lortat-Jacob *et al.*, 1996 [324].

OBJECTIFS DU PROJET

Les héparanes sulfates (HS) sont des polysaccharides hautement complexes de la famille des glycosaminoglycanes. Ils sont présents en abondance dans la matrice extracellulaire de la plupart des tissus. En plus de leur capacité intrinsèque de maintien de l'hydratation de la matrice extracellulaire, leurs fonctions sont très diverses du fait d'interactions avec de nombreuses protéines. En effet, ces interactions entre les protéines et les héparanes sulfates interviennent dans divers processus physiologiques, tels que la signalisation et la reconnaissance cellulaire mais également dans des processus pathologiques tels que les infections virales ou bactériennes et certains processus cancéreux. L'interaction de l'IFN γ avec les HS a été mise en évidence depuis 1990 par Lortat-Jacob *et al.* [314].

L'IFN γ est une cytokine homodimérique. Il est exprimé par les cellules tueuses (NK ou NKT) et les lymphocytes (CD4 Th1 et CD8) [15]. C'est un immunomodulateur puissant doté d'un pouvoir antiviral et anti-tumoral [88, 90]. Son implication dans la régulation de la réponse immunologique est essentielle autant dans l'immunité innée qu'adaptative. De ce fait, un défaut dans l'expression ou la signalisation de l'IFN γ est associé aux maladies infectieuses ou liées au système immunitaire comme la maladie de Crohn, la tuberculose ou encore certains cancers [114, 121].

A la surface cellulaire, l'IFN γ possède deux ligands à haute affinité : son récepteur et les HS. L'interaction avec le premier déclenche la signalisation intracellulaire majoritairement via la voie JAK-STAT. Par ce mécanisme, l'expression des gènes régulés par l'IFN γ est activée [52, 55]. Le rôle du second partenaire, les HS, est plus complexe et moins bien compris. Cependant certaines fonctions lui sont déjà attribuées. En effet, via l'interaction avec les HS, l'IFN γ est très rapidement, après sa sécrétion, concentré à la surface cellulaire [324]. Il a également été démontré que l'IFN γ n'est pas distribué de façon homogène dans les tissus mais localisé dans des zones particulières caractérisées par une haute densité d'HS [323]. De plus, cette interaction régule l'activité de l'IFN γ par le biais d'une protection partielle de l'extrémité C-terminale de la protéine [80, 277, 326].

Le site d'interaction pour les HS a été défini comme étant la partie C-terminale de l'IFN γ . Cette partie contient deux domaines basiques, nommés D1 et D2, qui sont particulièrement importants dans cette interaction [87]. Le domaine C-terminal de l'IFN γ est également

impliqué dans l'interaction avec son récepteur et sa protéolyse partielle ou complète modifie fortement l'activité de l'IFN γ .

Aucune étude n'a démontré, à ce jour, l'importance individuelle de chaque résidu basique du domaine C-terminal de l'IFN γ pour l'interaction avec le récepteur ou avec les HS et son importance dans l'activité biologique de l'IFN γ . La première partie de mon travail sera consacré à l'élucidation de ce point.

Pour cela, différents mutants de l'extrémité C-terminale de l'IFN γ seront exprimés et purifiés. Des tests d'interaction par Résonance Magnétique Nucléaire et par Résonance Plasmonique de Surface entre ces mutants et les HS ou le récepteur de l'IFN γ seront menés ainsi que des tests d'activité antivirale. Ces travaux mettront en avant l'importance de ces résidus dans l'interaction de l'IFN γ avec ses deux partenaires et dans son activité. Enfin, afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de cette interaction, une étude thermodynamique sera mise en place, utilisant la calorimétrie de titration isotherme.

En ce qui concerne la séquence oligosaccharidique liant les protéines, et dans notre cas l'IFN γ , leur détermination reste particulièrement complexe. En effet, les HS sont par nature très hétérogènes, ce qui implique la présence d'une multitude de séquences et donc de sites potentiels d'interaction. L'élucidation du site d'interaction reste une étape importante pour la compréhension de l'interaction et de sa fonction. Il sera notamment intéressant de déterminer la spécificité du site d'interaction de l'IFN γ sur les HS. Se compose-t-il d'une séquence oligosaccharidique spécifique ou de plusieurs séquences d'HS. Sont-elles susceptibles de lier l'IFN γ ?

Un modèle du site d'interaction entre les HS et l'IFN γ a été proposé par Lortat-Jacob [304]. Dans ce modèle, deux domaines NS, avec une taille minimale de quatre disaccharides, interagissent avec les deux parties C-terminales de l'IFN γ . Ces domaines NS sont maintenus à une certaine distance grâce à un domaine interne de type NA de quinze à seize disaccharides, qui n'interagit pas directement avec l'IFN γ . Une molécule synthétique, appelée 2O₁₀, a déjà été conçue comme mime de ce site d'interaction. Elle inhibe l'interaction de l'IFN γ à la fois avec son récepteur et avec les HS [320-321].

Par contre, aucune information n'est connue sur l'importance des groupements sulfates et des épimérisations particulières des HS pour l'interaction avec l'IFN γ . En effet, dans ce mime l'octasaccharide liant l'IFN γ est constitué de la répétition homogène d'un disaccharide de type GlcNS6S-IdoA2S. Il sera intéressant de déterminer les groupements sulfates et les épimérisations qui sont nécessaires à l'interaction de l'IFN γ avec les HS. L'affinité et la

spécificité du mime 20₁₀, intégrant ces aspects peuvent potentiellement augmenter pour l'IFN γ . La détermination du profil de sulfatation impliqué dans l'interaction avec l'IFN γ est également important pour la compréhension du mécanisme de signalisation de l'IFN γ . En effet, le mécanisme avec lequel l'IFN γ se translocalise d'HS vers son récepteur à la surface cellulaire est encore mal compris à ce jour. Une compréhension détaillée de l'interaction entre l'IFN γ et les HS peut potentiellement éclairer ce point.

Pour cette raison nous avons tenté d'identifier les groupements sulfates des octasaccharides importants pour l'interaction avec l'IFN γ . Pour cela, une banque d'octasaccharides issue d'HS avec des degrés de sulfatation particuliers sera obtenue. Ces différents octasaccharides seront utilisés dans divers tests d'interaction afin de déterminer l'importance du degré de l'interaction entre les HS et l'IFN γ . Enfin, des tests de cristallogenèse du complexe IFN γ -HS seront menés, employant des oligosaccharides de synthèse, dans le but de visualiser les groupements sulfates impliqués dans l'interaction.

MATERIEL ET METHODES

I. Expression et purification de l'IFN γ WT et mutants

I.1. Expression de l'IFN γ

Les vecteurs d'expression pET11a contenant les inserts de l'ADNc humain de l'IFN γ , sauvage ou muté, étaient disponibles dans le laboratoire [327].

*I.1.a. Transformation des bactéries *E. coli* avec le plasmide de l'IFN γ*

Dix ng de vecteur pET11a/IFN γ WT ou les vecteurs des mutants d'IFN γ obtenus par mutagenèse dirigée (*via* QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit –Stratagene®) sont incubés avec des bactéries *E.coli* BL21 Star (DE3) pendant 30 min sur de la glace avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 90 s. Après refroidissement, 250 μ L de milieu riche SOC (Life Technologies®) sont ajoutés au mélange avant d'être incubé à 37°C pendant 2 h sous agitation avant d'être étalé sur une boîte de Petri composée du milieu agar-LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. La boîte de Petri est ensuite placée à 37°C pendant une nuit. Les colonies sont par la suite gardées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

*I.1.b. Expression de l'IFN γ par des bactéries *E. coli**

Une préculture est préparée par l'inoculation d'une colonie dans 50 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline 100 μ g/mL et mise sous agitation à 37°C pendant la nuit. Cette préculture est utilisée pour inoculer 1 L de milieu LB contenant de l'ampicilline 10 μ g/mL puis mise sous agitation à 37°C. La croissance bactérienne est vérifiée par une mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm. Lorsque les bactéries sont en phase exponentielle ($DO_{600\text{ nm}} = 0,6$) l'expression est déclenchée par l'ajout de l'isopropyl thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) 0,5 mM. Après 5 h d'induction sous agitation à 37°C, la culture bactérienne est récupérée par centrifugation et le culot est congelé ou directement utilisé. Afin d'obtenir l'IFN γ marqué au ^{13}C et ^{15}N pour les expériences de RMN, le milieu LB est

remplacé par un milieu minimum M9 contenant du ^{13}C -glucose 2 g/L et du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 1 g/L comme sources unique de carbone et d'azote respectivement.

I.2. Purification de l'IFN γ

I.2.a. Purification de l'IFN γ WT et mutants ponctuels

L'IFN γ WT et les mutants ponctuels de l'IFN γ sont purifiés par le protocole décrit par Sarrazin *et al.* [320] détaillé ci-dessous :

- **Lyse des bactéries**

Les bactéries sont récupérées par centrifugation (5000 g, 15 min), puis le culot est lavé avec un tampon de lyse (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2). La lyse des bactéries est effectuée en reprenant les bactéries par ce même tampon dans lequel de l'AEBSF 1mM et du lysozyme 0,4 mg/mL ont été ajoutés. Après incubation (30 min à température ambiante), les bactéries sont cassées à l'aide de la presse de French. L'ADN libéré est digéré par la DNaseI 16 $\mu\text{g/mL}$ en présence du MnCl_2 10 mM.

- **Lavage et solubilisation des corps d'inclusion (CI)**

Du triton (X-100) 5 % et de l'urée 2 M sont ajoutés au lysat bactérien avant d'effectuer une centrifugation (10 000 g, 10 min) permettant de récupérer les CI dans le culot. Les CI sont ensuite lavés avec le tampon de lyse contenant de l'urée 2 M avant d'être finalement lavés avec le tampon de lyse seul. Après estimation de la concentration par SDS-PAGE et en comparaison avec un standard de BSA, les CI sont solubilisés (2 h à 54°C) dans le tampon de lyse contenant du chlorure de guanidinium 6 M afin d'obtenir une concentration finale de l'IFN γ de 2,4 mg/mL.

- **Repliement de l'IFN γ**

Après centrifugation (30 000 g, 20 min), le surnageant est dilué 12 fois dans un tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7,5 contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche[®]) et gardé à 4°C pendant une nuit pour permettre le repliement de l'IFN γ . Le lendemain, une centrifugation (30 000 g, 20 min) permet finalement de séparer l'IFN γ correctement replié de celui qui est agrégé.

- **Chromatographie d'échange de cations**

L'IFN γ correctement replié est ensuite dilué deux fois dans un tampon Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6,0 et chargé sur une colonne Source 15S (10 mL, GE Healthcare®) à un débit de 1 mL/min. Les protéines adsorbées sont ensuite éluées grâce à un gradient allant de 0 à 1 M de NaCl (60 mL) dans un tampon Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6,8. Les fractions contenant l'IFN γ , sont identifiées grâce à leur absorbance à une longueur d'onde de 280 nm. La présence de l'IFN γ dans les différentes fractions est ensuite vérifiée par SDS-PAGE avant d'être rassemblées et concentrées par centrifugation (Amicon Ultra MWCO –molecular weight cut off- 3 kDa, millipore®).

- **Chromatographie de filtration sur gel**

L'IFN γ concentré est chromatographié sur une colonne Superdex 75 (2 mL, Pharmacia®) à un débit de 0,7 mL/min, équilibrée dans un tampon contenant du Tris 20 mM, du mannitol 25 mg/mL, pH 6,8. Les fractions contenant l'IFN γ , visualisées par leur absorbance à une longueur d'onde de 280 nm et par SDS-PAGE, sont rassemblées puis stérilisées par filtration avant d'être congelées pour leur conservation. Pour les protéines utilisées dans des expériences de microcalorimétrie (ITC), la filtration sur gel se fait dans un tampon PBS.

I.2.b. Clonage et expression de la protéine de fusion IFN γ SD1-MBP

Le vecteur pDB.His.MBP contient le site promoteur pour la T7 DNA polymérase suivi de la MBP, d'une étiquette histidine puis d'un site de clivage à la protéase du TEV (Tobacco Etch Virus) et un MCS (Multiple Cloning Site).

- **Clonage de la protéine de fusion IFN γ SD1-MBP**

➤ Transformation d'*E.coli* Top10 par pET11a/IFN γ SD1 et pDB.His.MBP

Dix ng de vecteur pET11a/IFN γ SD1 ou de vecteur pDB.His.MBP sont incubés avec des bactéries *E.coli* TOP10 pendant 30 min sur de la glace suivie d'un choc thermique à 42°C pendant 90 s. Après refroidissement, 250 μ L de milieu riche SOC (Life Technologies®) est ajouté et incubé sous agitation pendant 2 h à 37°C avant d'être étalé sur une boîte de Pétri composé d'un milieu agar-LB contenant soit de l'ampicilline 100 μ g/mL (pour le vecteur pET11a) soit de la kanamycine 100 μ g/mL (pour le vecteur pDB). La boîte est ensuite placée à 37°C pendant une nuit, puis gardée à 4°C jusqu'à son utilisation.

➤ Purification de l'ADN plasmique

Une des colonies contenant soit le vecteur pET11a soit le vecteur pDB est piquée et inoculée dans 50 mL de milieu LB contenant respectivement de l'ampicilline 100 µg/mL ou de la kanamycine 50 µg/mL avant d'être incubée à 37°C sous agitation pendant une nuit. L'ADN plasmique est ensuite purifié à l'aide du kit de purification « Wizar Plus SV Midiprep » (Promega®). Son principe repose sur une lyse alcaline des bactéries et une purification du lysat sur une résine échangeuse d'anions retenant sélectivement l'ADN. Après les lavages, l'ADN plasmique est élué par de l'eau. La concentration de l'ADN plasmique est mesurée par son absorbance à une longueur d'onde de 260 nm.

➤ Coupage des vecteurs et purification avec *NdeI* et *BamHI*

L'ADN purifié est ensuite digéré par les enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI* (50 U/µL – Roche®). Pour cela, les vecteurs sont coupés en incubant à 37°C pendant 3 h, 5 ng de vecteur dissout dans 50 µL de tampon de digestion contenant du tampon D (Tris-HCl 6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 150 mM, 1 mM DTT, pH 7,9), de la *NdeI* 50 U/µL et de la *BamHI* 50 U/µL. Les vecteurs digérés sont repris en tampon de charge 6X (orange G 0,4%, bleu de bromophenol 0,03%, xylene cyanol FF 0,03%, Ficoll® 400 15 %, et EDTA 50 mM, Tris-HCl 10mM pH 7.5 Proméga®) et séparés sur gel d'agarose 0,8 % - contenant un marqueur d'ADN (CYBR®, Life Technologies®) - en tampon TAE 0,5X et visualisé par UV. La fraction correspondant au vecteur pDP.His.MBP et à l'insert du vecteur pET11a/IFNγSD1 contenant le gène IFNγSD1 est purifiée à l'aide d'un kit « QIAquick Gel Extraction Kit » (Qiagen®). Ce kit solubilise l'agarose puis purifie l'ADN par une membrane de silicium liant l'ADN en présence d'une concentration de sel élevée. Après des étapes de lavage, pour éliminer l'agarose et le CYBR, l'ADN est élué avec un tampon à faible concentration de sel. La concentration du vecteur pDB.His.MBP et de l'insert IFNγSD1 est mesurée par leur absorbance à une longueur d'onde de 260 nm.

➤ Ligation du vecteur pDB.His.MBP et insert IFNγSD1

Le vecteur et l'insert sont enfin couplés par l'utilisation du kit « Rapid DNA Ligation Kit » (Roche®) dans les conditions suivantes : 1,5 µL de vecteur pDB.His.MBP digéré, 7,5 µL d'insert IFNγSD1, 1 µL de T4 DNA ligase et 10 µL de tampon de ligation d'ADN sont incubés pendant 30 min à température ambiante. Des bactéries *E.coli TOP10* sont ensuite transformées comme décrit précédemment. Trois clones sont resuspendu avec 50 µL milieu de LB.

➤ Identification des clones contenant l'insert de l'IFN γ SD1

L'ADN plasmidique est purifié comme décrit précédemment mais en utilisant le « Wizar Plus SV Miniprep » (Promega®). L'ADN de l'insert est ensuite amplifié par PCR en utilisant le « PCR Master Mix » (Promega®). Pour cela, 10 μ L de solution Master Mix sont incubés avec 2 μ L de primer 1 (I1), 2 μ L de primer 2 (I2) et 2 μ L d'ADN plasmidique purifié à partir de dix colonies. Ce kit utilise la Taq-DNA-polymérase. Les produits de PCR sont ensuite analysés par gel d'agarose 0,8 % contenant le CYBR et sont visualisés par UV. Le clone positif, contenant l'insert, est ensuite séquencé (Génome Express®).

• **Expression de la protéine de fusion IFN γ SD1-MBP**

➤ Transformation des *E.coli* BL21 (Star) DE3

Dix ng de vecteur pDB.His.MBP/IFN γ SD1 sont utilisés pour transformer les bactéries *E.coli* BL21 Star (DE3) comme décrit précédemment.

➤ Test d'expression de la protéine de fusion IFN γ SD1-MBP

Une préculture est préparée par l'inoculation d'une colonie dans 20 mL de milieu LB contenant de la kanamycine 50 μ g/mL et mise sous agitation à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, 0,5 mL de cette préculture sont utilisés pour inoculer 10 mL de milieu LB contenant de la kanamycine 50 μ g/mL et est mise sous agitation à 37°C. La croissance bactérienne est vérifiée par densité optique à une longueur d'onde de 600 nm. Lorsque, les bactéries sont en phase exponentielle ($DO_{600\text{ nm}} = 0.6$) l'expression est déclenchée par l'ajout de l'IPTG à 0,5 mM ou à 1 mM. Après 5 h, 7 h ou 22 h d'induction, la culture bactérienne, mise sous agitation à 37°C ou à 22°C, est récupérée par centrifugation. Les bactéries sont ensuite reprises dans le tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,2,) et incubées avec du lysozyme 0,4 mg/mL et de l'AEBSF 1mM pendant 30 min à température ambiante avant d'être lysées par trois cycles de congélation-décongélation : les bactéries sont congelées dans un bain de carboglace/éthanol puis décongelées dans un bain d'eau à 37°C. Les parties solubles et non solubles sont récupérées par centrifugation des bactéries lysées (30 min à 10 000 g). L'expression des protéines est ensuite analysée par SDS-PAGE.

• **Purification de la protéine IFN γ SD1-MBP**

➤ Expression de la protéine de fusion IFN γ SD1-MBP

Une culture de 50 mL de milieu de LB contenant de la kanamycine 50 μ g/mL est inoculée par une préculture (comme décrit dans le paragraphe précédent) et mise sous agitation à 37°C. La croissance bactérienne est vérifiée par densité optique à une longueur d'onde de 600 nm. Lorsque les bactéries sont en phase exponentielle ($DO_{600\text{ nm}} = 0,6$), l'expression est

déclenchée par l'ajout de l'IPTG 0,5 mM pendant 22 h à 22°C. Les bactéries sont ensuite lysées et le surnageant récupéré comme décrit dans le paragraphe précédent.

➤ Purification de la protéine de fusion IFN γ SD1-MBP par colonne de nickel

Le surnageant de la lyse bactérienne est mis en présence d'une résine de nickel (500 μ L), puis incubé pendant 2 h à 4°C. Après la mise en colonne de la résine, les protéines et contaminants non liés à la colonne sont élués par un tampon contenant du HEPES 50 mM, du NaCl 150 mM, de l'imidazole 30 mM, pH 8,0 (2,5 mL). La protéine de fusion IFN γ SD1-MBP est ensuite éluee *via* gravité par ce même tampon contenant de l'EDTA 300 mM (2,5 mL).

1.2.c. Purification de l'IFN γ SD1, SD2, Δ 136 et Δ 124

L'IFN γ SD1, l'IFN γ SD2, l'IFN γ Δ 136 et l'IFN γ Δ 124 sont purifiés selon le protocole décrit par Arora et Khanna [328] avec des modifications mineures (voir ci-dessous).

Pour cela, les CI sont récupérés et lavés de la même manière que l'IFN γ WT, précédemment décrit. Cependant après l'estimation de leur concentration par SDS-PAGE, ils sont solubilisés à 10 mg/mL dans le tampon de lyse contenant du chlorure de guanidinium 6 M.

- **Repliement de l'IFN γ**

Après centrifugation (30 000 g, 20 min), le surnageant est dilué 28 fois, dans un tampon contenant du Tris-HCl 100 mM, de l'EDTA 0,2 mM, du L-arginine 0,5 M, pH 8 auquel a été ajouté le cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche®). La solution est gardée à 4°C pendant une nuit permettant le repliement de l'IFN γ . Le lendemain, une centrifugation (30 000 g, 20 min) permet de séparer l'IFN γ correctement replié de celui qui est agrégé.

- **Dialyse de l'IFN γ**

Afin de pouvoir purifier l'IFN γ par colonne échangeuse d'anions, une dialyse est nécessaire pour enlever la L-Arginine. Pour cela, la solution contenant l'IFN γ repliée est dialysée contre un tampon 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 contenant 100 mM d'urée et le cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche®) avec des membranes de dialyse Spectra por7 avec un MWCO de 10 kDa pendant 24 h à 4°C.

- **Chromatographie d'échange de cations**

Après centrifugation (30 000 g, 30 min), le pH du surnageant est abaissé jusqu'à atteindre un pH de 6,8 par l'ajout de l'HCl à 3,7 %. La solution contenant l'IFN γ est ensuite chargée sur une colonne Source 15S (10 mL, GE Healthcare®) à un débit de 1 mL/min. Les protéines adsorbées sont ensuite éluées grâce à un gradient de NaCl de 0 à 1 M : de 0-0,25 M NaCl en

30 mL puis de 0,25-1 M NaCl en 40 mL - dans un tampon contenant du Tris-HCl 20 mM, de l'urée 100 mM, pH 6,8.

Les étapes de concentration des fractions contenant l'IFN γ ainsi que l'étape de filtration sur gel sont identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent.

I.3. Electrophorèse des protéines

Afin de suivre chaque étape de la purification, un SDS-PAGE est effectué (gel de concentration 4 %, gel de séparation 15 %) dans lequel les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire (MM). Une quantité équivalente de la culture cellulaire est diluée dans un tampon dénaturant (Tris/HCl 30 mM, SDS 1 %, glycérol 5 %, bleu de bromophénol 0,1 %, pH 6,8). Un marqueur de poids moléculaire (PageRuler Prestained Protein Ladder - Fermentas®) est également déposé pour estimer le poids moléculaire des protéines. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel que l'on fait migrer à une intensité d'environ 30 mA dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1 %). Les protéines sont visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie. Pour cela, le gel est incubé pendant 20 min dans le milieu de coloration (bleu de Coomassie R250 1g/L, méthanol 50 % v/v, acide acétique 8 % v/v) puis décoloré par des lavages dans le milieu de décoloration (éthanol 10 %, acide acétique 7 %).

II. Caractérisation du site d'interaction de l'IFN γ pour les HS/Hp et pour l'IFN γ R

II.1. Test d'interaction de l'IFN γ avec des oligosaccharides issus d' Hp par RMN

L'enregistrement des spectres RMN de l'échantillon est réalisé sur un spectromètre de 600 MHz ou de 800 MHz (Varian[®]), équipé d'une cryosonde à 27°C dans un tampon 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6,0 contenant 10 % de D₂O. L'attribution des déplacements chimiques des résonances des atomes de la chaîne principale des 125 premiers résidus de l'IFN γ a déjà été publiée [37] et est utilisée. Celle des derniers résidus de l'IFN γ (126-143) est attribuée sur un échantillon de ¹⁵N, ¹³C IFN γ à 1,2 mM à partir de deux spectres 4D HNCOCACB et 4D CBCACONH.

Pour les titrations de l'IFN γ avec des oligosaccharides (dp2, dp4 et dp8, avec dp pour degré de polymérisation) issus d'Hp, 9 mM de chaque oligosaccharide sont progressivement ajoutés à une solution d'IFN γ (54 μ M pour la titration avec dp4 et dp8 et 72 μ M pour la titration avec dp2) dans un tampon contenant du Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM, du D₂O 10 %, pH 6,0. Les spectres ¹⁵N-HSQC sont enregistrés après chaque ajout. Les changements des déplacements chimiques des groupements amides de chaque résidu de l'IFN γ sont calculés entre le déplacement chimique de l'IFN γ seul et le déplacement chimique de l'IFN γ titré à la plus haute concentration d'oligosaccharide (avec un ratio oligosaccharide:IFN γ de 8,2 pour le dp2, de 3,7 pour le dp4 et 1,11 pour le dp8). Les valeurs du changement du déplacement chimique sont calculées à partir de la formule :

$$dNH = \sqrt{dH^2 + (dN/10)^2}$$

Avec dNH le déplacement chimique combiné du groupement amide d'un acide aminé, dH le déplacement chimique de son proton (¹H) et dN le déplacement chimique de son azote (¹⁵N).

II.2. Test d'interaction par SPR (Biacore[®])

II.2.a. Principe du fonctionnement du BIAcore

Le système BIAcore repose sur le principe de la SPR. Il permet de mesurer en temps réel des interactions entre différentes molécules et ainsi d'en déduire éventuellement les

caractéristiques cinétiques. Pour cela un faisceau de lumière (en condition de réflexion interne totale) illumine continuellement la sensor chip (surface activée) et mesure les changements d'indices de réfraction lorsqu'un analyte est apporté par une cartouche micro-fluidique sur la sensor chip où le ligand est immobilisé (figure 40).

Ainsi, la protéine (ou le ligand d'une autre nature) est immobilisée sur la sensor chip de manière covalente ou par capture sur une couche de dextran carboxyméthylé de la puce. Cette couche de dextran est posée sur une feuille d'or, elle-même posée sur une plaque de verre. Une cartouche micro-fluidique apporte l'analyte avec un débit constant sur la sensor chip. De l'autre côté de la sensor chip se trouve un prisme qui est essentiel pour la détection de l'interaction. En effet, un faisceau de lumière monochromatique polarisée illumine continuellement la sensor chip (avec un angle précis appelé angle de TIR pour Total Internal Reflection). Une partie des photons de la lumière entrent en résonance avec les électrons libres de la sensor chip, abondamment présents, du fait de la présence de la couche d'or. Le faisceau de lumière est ensuite réfléchi mais à un certain angle - appelé l'angle de résonance - l'intensité de la lumière réfléchie est moins intense du fait de la résonance du faisceau de lumière avec la couche d'or. Cet angle de résonance dépend de l'indice de réfraction du milieu. Lorsqu'un analyte se fixe sur le ligand immobilisé à la surface du sensor chip, l'indice de réfraction change et ainsi l'angle de résonance. Le suivi de la variation de l'angle de résonance se traduit par un diagramme appelé sensorgramme qui permet de suivre en temps réel la fixation de l'analyte injecté sur le ligand immobilisé.

En règle générale, la mesure de l'interaction se fait en 4 phases. (1) Immobilisation du ligand sur la sensor chip. (2) Apport de l'analyte par cartouche micro-fluidique sur la sensor chip et association potentielle avec le ligand immobilisé. (3) Dissociation spontanée de l'analyte après son injection. (4) Régénération de la surface par un agent chimique afin de dissocier tout l'analyte immobilisé qui ne s'est pas enlevé lors de la phase de la dissociation spontanée.

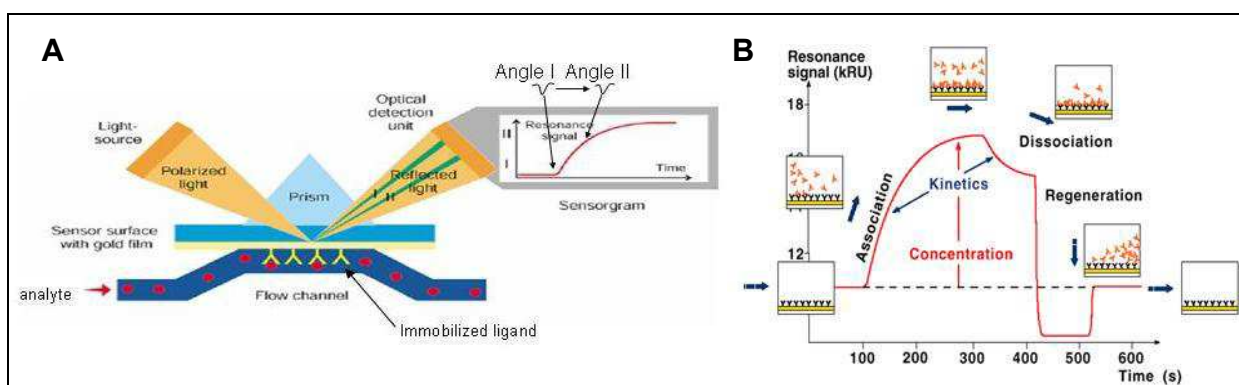


Figure 40 : Principe du fonctionnement de la résonance plasmonique de surface.

A. Principe de l'appareil BIAcore exploitant la technologie SPR. B. exemple d'un sensorgramme typique.

II.2.b. Biotinylation du récepteur

La partie extracellulaire de l'IFN γ R α (IFN γ R1 humain recombinant-CD119 673-IR-100/CF, R&D Systems[®]) est diluée à 8 μ M dans un tampon contenant du Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM, pH 6,0. Les glycanes présents dans la molécule sont oxydés en aldéhydes, en incubant l'IFN γ R α avec du periodate de sodium 10 mM à l'abri de la lumière pendant 20 min à 4°C. La réaction est arrêtée par l'ajout du glycérol 15 mM. Après dialyse contre un tampon contenant du Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM, pH 6,0; de la biotine-hydrazide 5 mM est ajoutée puis le mélange est incubé pendant 5 h 30 à 4°C afin de former une liaison hydrazone stable entre l'hydrazide et l'aldéhyde. La réaction est arrêtée par l'ajout de l'éthanolamine 100 mM et le tout est dialysé contre du PBS.

II.2.c. Fonctionnalisation des surfaces

Le système BIAcore 3000 (GE healthcare[®]) est utilisé pour toutes les expériences avec une sensor chip CM4, qui est recouverte d'une couche de dextran contenant des carboxyméthyles à faible densité. La sensor chip possède 4 pistes, qui sont utilisées deux par deux : les pistes 1 et 3 comme contrôle négatif où seule la streptavidine est immobilisée et les pistes 2 et 4 contenant de l'Hp ou de l'IFN γ R α immobilisé.

L'Hp et l'IFN γ R α sont immobilisés par le biais de l'interaction entre la streptavidine, préalablement immobilisée sur la sensor chip, et la biotine attachée à l'Hp ou à l'IFN γ R α . Pour l'immobilisation de la streptavidine, les acides carboxyliques de la sensor chip doivent être activés avant d'interagir avec les groupements amines primaires de celle-ci. Pour cela, la surface est activée par l'injection de 50 μ L d'un mélange du N'éthyl-N'-(diéthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) 200 mM et du N-hydroxysuccinimide (NHS) 50 mM à 5 μ L/min sur les deux surfaces. Après cette activation, la streptavidine (100 μ g/mL dans un tampon contenant de l'acétate de sodium 10 mM, pH 4,5) y est immobilisée. Les carboxyles n'ayant pas réagi avec la streptavidine sont bloqués par l'ajout de 50 μ L d'éthanolamine 1 M à pH 8,5.

L'Hp (9kDa)-biotinylée est disponible au laboratoire. L'Hp-biotinylée à 5 μ g/mL ou l'IFN γ R α biotinylé à 40 μ g/mL sont injectés sur la surface préalablement préparée jusqu'à fixation de 40 RU et 800 RU respectivement. Ces surfaces sont ensuite rincées (par trois lavages successifs) avec 10 μ L de NaCl à 2 M pour la surface contenant de l'Hp et 10 μ L d'HCl à 10 mM pour la surface avec l'IFN γ R α .

II.2.d. *Test d'interaction avec le récepteur et l'Hp*

Pour les tests d'interaction, l'IFN γ est dilué dans le tampon HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, détergent P20 0,005 % v/v, pH 7,4) entre 0 et 15 nM puis injecté à 60 μ L/min pendant 5 min à 25°C sur la surface contrôle et celle contenant l'Hp ou l'IFN γ R α . Après une phase de dissociation, la surface est régénérée par l'injection de NaCl à 2 M pendant 5 min à 60 μ L/min pour l'Hp et par l'injection d'HCl à 10 mM pendant 1 min à 60 μ L/min pour l'IFN γ R α . Pour les mutants en série ou de délétion les concentrations de l'IFN γ sont augmentées afin d'observer un signal d'interaction. Les sensorgrammes obtenus sont analysés avec le logiciel BIAevaluation 3.0.

II.3. Calorimétrie de titration isotherme

II.3.a. *Principe de fonctionnement de la titration calorimétrie isothermale*

Dans une expérience d'ITC, représentée sur la figure 41, le ligand contenu dans une seringue, est titré dans une solution d'analyte présente dans la cellule d'analyse qui est maintenue à une température constante (25°C dans notre cas). La chaleur libérée ou absorbée dans la cellule d'analyse est mesurée par rapport à une cellule de référence après chaque ajout de ligand. Elle est ensuite exprimée comme la puissance électrique (μ cal/s) de l'apport de chaleur nécessaire pour maintenir les deux cellules à la même température. Ces deux cellules sont placées dans un récipient adiabatique. Quand l'analyte est saturé par le ligand, le signal de l'apport de chaleur nécessaire pour maintenir les deux cellules à la même température après ajout du ligand est fortement diminué et correspond à la chaleur de dilution de l'analyte.

L'intégration de l'énergie enregistrée permet l'extraction de la variation d'enthalpie ΔH (kcal/mol), de la constante de dissociation K_A (M^{-1}) et de la stœchiométrie d'interaction (n). La variation d'entropie ΔS (kcal/(K.mol)) et de l'énergie libre de Gibbs ΔG (kcal/mol) peuvent être déduites par les relations suivantes :

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = RT \ln K_A$$

avec R la constante universelle des gaz parfaits et T la température en Kelvin.

Il est évident que la puissance électrique nécessaire pour maintenir les deux cellules à la même température est très faible. Des appareils de plus en plus sensibles permettent l'analyse d'interactions caractérisées par des constantes d'affinité entre $10^2 M^{-1}$ et $10^9 M^{-1}$ employant une quantité d'analytes et de ligands de l'ordre du milligramme ce qui reste acceptable [329].

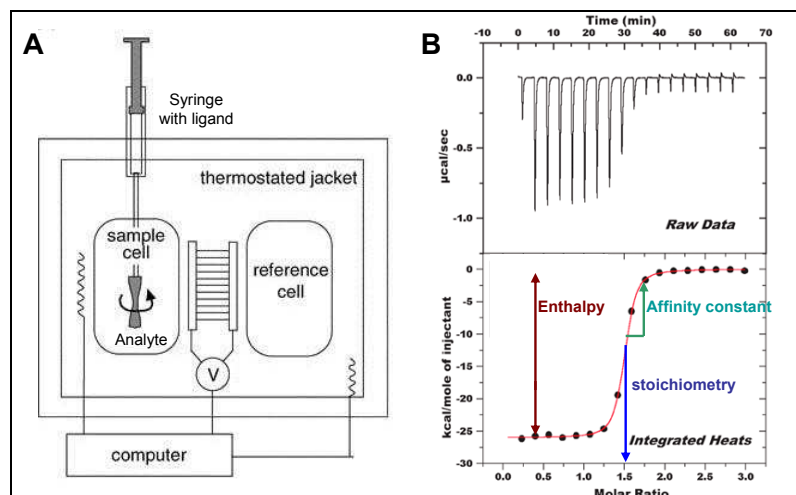


Figure 41 : Principe de fonctionnement de la calorimétrie de titration isotherme.

A. Configuration de l'ITC. B. Profil de titration classiquement obtenu. En haut se retrouve la courbe de titration avec les données brutes représentant la chaleur dégagée par l'injection de ligands. En bas, est illustrée l'intégration de cette courbe de titration. La variation d'enthalpie, la stœchiométrie et la constante d'affinité sont directement déterminées. La variation d'énergie libre de Gibbs et la variation d'entropie sont calculées à partir de ces données.

II.3.b. Mesure de la thermodynamique de l'interaction IFN γ :Hp

Les expérimentations ont été réalisées à 25°C avec le calorimètre de titration isotherme VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal GE Healthcare®). L'IFN γ WT et les différents mutants utilisés ainsi que différents oligosaccharides issus d'Hp sont dissous dans du PBS et dégazés avant la titration. Dans tous ces essais, la concentration de l'IFN γ est exprimée en moles de monomère.

Dans les expériences d'ITC en mode « classique », la solution de protéine est placée dans la cellule (1,4478 mL) et la solution d'oligosaccharide dans la seringue (500 μ L). Trente injections de 10 μ L de la solution d'oligosaccharide issus d'Hp sont ajoutées à la cellule toutes les 300 s puis la quantité de chaleur (μ cal/s) nécessaire pour maintenir la cellule de titration à une température constante (25°C) est mesurée après chaque ajout de ligand. La chaleur de dilution est par ailleurs quantifiée par la titration de l'oligosaccharide dans une solution de tampon. Elle est relativement faible mais utilisée pour corriger les données.

Dans l'analyse des oligosaccharides de différentes tailles, du dp2 trisulfaté (IdoA,2S-GlcNS,6S) 450 μ M, du dp4 225 μ M et du dp8 112,5 μ M sont titrés dans une solution de l'IFN γ WT 20 μ M. Pour les titrations de l'IFN γ SD1 et de l'IFN γ SD2, du dp8 112,5 μ M est titré dans respectivement 40 μ M ou 37,5 μ M de protéine. Enfin pour la titration de l'IFN γ Δ 136, du dp8 1 mM est titré dans 100 μ M de protéine.

Dans les expériences d'ITC en mode « inverse », la solution d'oligosaccharide est placée dans la cellule et celle de la protéine dans la seringue, puis les mêmes titrations que précédemment décrits sont effectuées. De la même façon que pour l'ITC en mode « classique », la chaleur de dilution est mesurée par titration de l'IFN γ dans une solution de tampon et est incluse dans l'analyse. Dans ces essais, de l'IFN γ WT 310 μ M ou de l'IFN γ Δ 136 500 μ M sont titrés dans respectivement 20 ou 50 μ M de dp8.

Les données brutes obtenues (en μ cal/s) sont intégrées, corrigées pour la chaleur de dilution puis normalisées afin d'obtenir un thermogramme de changement de l'enthalpie par mole de ligand injecté (ΔH , kcal/mol) par rapport au ratio molaire d'analyte sur ligand. La courbe intégrée est analysée avec le logiciel MicroCal Origin 7 (Microcal Software GE Healthcare®) par régression non linéaire en utilisant un modèle d'interaction simple type 1:1 employant l'équation :

$$\frac{dQ}{d[X]_t} = \frac{\Delta H^0 V_0}{2} \left[1 + \left(\frac{1 - [X]_t / [M]_t - n / K_a [M]_t}{\sqrt{(1 + [X]_t / [M]_t + 2 / K_a [M]_t)^2 - 4 [X]_t / [M]_t}} \right) \right]$$

Avec $[X]_t$ et $[M]_t$ les concentrations totales du ligand et de l'analyte, $V_0 = 1.4478$ mL étant le volume de la cellule et dQ le différentiel de la chaleur après chaque ajout de ligand.

Avec cette analyse, la stœchiométrie (n), la constante d'association (K_a) et l'enthalpie (ΔH) sont déterminées. L'énergie libre de Gibbs (ΔG) et l'entropie (ΔS) sont calculées grâce à l'équation :

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = RT \ln K_a$$

Avec $R = 8.314$ Jmol⁻¹K, la constante universelle des gaz parfaits et $T = 298.15$ K, la température en Kelvin.

II.4.Mesure de l'activité biologique de l'IFN γ

II.4.a. Mesure de l'activité antivirale de l'IFN γ

Les cellules WISH (une lignée cellulaire de type épithéliales d'origine amniotiques humaines) sont mises en culture dans du milieu DMEM contenant de la pénicilline 100 U/mL, de la streptomycine 100 μ g/mL et du sérum de veau fœtal (SVF) 10 %. A confluence, les cellules WISH, ensemencées la veille à 20 000 cellules par puits, sont traitées avec de l'IFN γ 0-150 pM pendant 24 h. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS avant d'être mises en présence du virus VSV (Vesicular Stomatitis Virus) dilué dans le milieu de culture

(contenant uniquement 2 % de SVF). Après 48 h, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS, puis 150 μ L de milieu de culture contenant 50 μ L de réactif XTT (cell proliferation kit Roche[®]), permettant de mesurer la viabilité cellulaire, sont ajoutés. Après 3 h d'incubation avec le réactif, l'absorbance à une longueur d'onde de 450 nm est enregistrée. L'IC₅₀, correspondant à la quantité d'IFN γ permettant la survie de 50 % des cellules, est déterminée par le logiciel Sigmafit.

II.4.b. *Mesure de l'activité antivirale de l'IFN γ sur les cellules dépourvues d'HS*

Des cellules WISH confluentes,ensemencées la veille à 20 000 cellules par puits, sont traitées avec de l'héparinase I 10 mU/mL et de l'héparinase III 10 mU/mL (Grampian Enzymes[®]) pendant 90 min à 37°C. Les deux héparinases sont d'origine *Flavobacterium heparinum*, leur spécificité de substrat est illustrée sur la figure 26 p.58. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS avant d'être incubées avec de l'IFN γ (0-150 pM) supplémenté de de l'héparinase I 10 mU/mL et de l'héparinase III 10 mU/mL. Après 4 h, le milieu, contenant de l'IFN γ et des héparinases, est enlevé. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS puis du milieu de culture sans IFN γ et sans héparinases est ajouté. Le lendemain, les cellules sont incubées avec du virus VSV et la détection des cellules vivantes est identique à ce qui a été décrit précédemment.

En parallèle avec la détermination de l'activité antivirale des cellules traitées avec les héparinases, des cellules non traitées sont analysées afin de pouvoir comparer les deux. Pour cela, le même protocole que celui décrit ci-dessus est utilisé en incubant les cellules dans le milieu de culture seul.

III. Recherche du site d'interaction des HS pour l'IFN γ

III.1. Préparation d'une banque d'oligosaccharides

III.1.a. Digestion d'HS avec de l'héparinase III

Dix g d'HS issus de la muqueuse intestinale de porc sont dépolymérisés par l'ajout d'héparinase III (Grampian Enzymes[®]) à 25 mU/mL dans un tampon contenant du Tris-HCl 5 mM, du CaCl₂ 2 mM, de la BSA, 50 mM et du NaCl, pH 7,5. Après 72 h à 30°C, de l'héparinase III 12,5 mU/mL est ajouté, avant d'être de nouveau incubé à 30°C pendant 72 h. La réaction est suivie grâce à l'absorbance à une longueur d'onde de 232 nm des liaisons non saturées des acides uroniques formés. La réaction est arrêtée en chauffant la solution pendant 5 min à 100°C. L'échantillon est centrifugé à 12 000 rpm pendant 5 min, pour précipiter l'enzyme. Puis le surnageant contenant l'HS digéré est congelé en fraction de 1 g.

III.1.b. Séparation par taille par filtration sur gel sur Biogel P10

La colonne Biogel P10 (1500 mm x 44 mm, Bio-Rad[®]) est préalablement équilibrée dans une solution d'H₂O et du NaCl 200 mM à 1 mL/min. De l'HS digéré (1 g) est déposé sur la colonne et des fractions de 15 mL sont récoltées avant d'être analysées par absorbance à une longueur d'onde de 232 nm. Seules les fractions correspondant au sommet de chaque pic sont réunies et conservées afin d'obtenir des fractions homogènes en taille. Les fractions correspondant à une taille comprise entre dp2 et dp14 sont ensuite dialysées contre de l'eau avant d'être lyophilisées. La masse pour chaque taille d'oligosaccharide est estimée par pesée.

III.1.c. Préparation d'une banque d'octasaccharides

Dans l'intention d'obtenir une banque de dp8 avec des espèces ayant un taux de charge homogène, les dp8, préparés par Biogel P10, sont séparés par une colonne échangeuse d'anions Propac (PA1 9 mm x 250 mm, Dionex[®]). Cette colonne est équilibrée dans de l'H₂O-HCl ultrapur (Sigma Aldrich[®]), pH 3,5 à 5 mL/min. Après injection de 7,5 mg de dp8, la colonne est rincée pendant 5 min avec de l'H₂O-HCl, pH 3,5. Un gradient de 0 à 1 M de

NaCl (0-0,5 M en 50 mL puis de 0,5-1 M en 400 mL) est ensuite appliqué afin d'éluer les différentes espèces de dp8 collectés par fractions de 2,5 mL. Leur élution est suivie par l'absorbance à 232 nm et 23 différentes espèces sont identifiées. Cette chromatographie est répétée six fois, toutes donnant des profils d'élution extrêmement comparables. Les fractions des 23 espèces des différentes préparations sont réunies puis dialysées et lyophilisées. Les échantillons sont repris dans de l'eau. Une partie de l'échantillon est hydrolysée à 95°C dans une solution HCl 6N/phenol pendant une nuit pour la quantification des glucosamines (Françoise Baleux, Institut Pasteur).

III.2. Analyse de la banque de dp8 par MALDI-TOF-MS

III.2.a. Principe de la technique de la MALDI-TOF-MS

La MALDI est une technique d'ionisation douce générant, en mode négatif des molécules déprotonées permettant l'analyse de molécules ayant une masse moléculaire entre 400 Da et 400 kDa et ceci avec des limites de détection inférieures à la picomole.

Pour l'analyse par MALDI-MS, l'échantillon est tout d'abord co-cristallisé, sur un support d'acier inoxydable spécifique, avec des molécules de la matrice. Ensuite, il est ionisé par irradiation à partir d'une impulsion laser dirigée sur ces cristaux préalablement formés. La matrice absorbe une partie de l'énergie du laser et *via* un jeu de transferts d'énergie et une cascade de désolvatation de l'échantillon, les molécules présentes dans celui-ci sont ionisées et volatilisées. Ces étapes de transfert d'énergie et de désolvatation sont si rapides, que la destruction de l'échantillon par pyrolyse est limitée.

La matrice joue un rôle primordial dans l'ionisation de l'échantillon en limitant sa destruction. Elle doit répondre aux critères suivants : (1) elle doit être soluble dans un solvant compatible avec celui de l'échantillon, (2) elle doit être facilement et rapidement cristallisable tout en incorporant les molécules de l'échantillon de façon homogène, (3) elle doit pouvoir absorber l'énergie du laser, (4) elle doit être capable de désorber l'échantillon et de l'ioniser par transfert de protons. Dans le cas de l'analyse des oligosaccharides hautement acides, les matrices sont particulièrement importantes pour éviter que ces oligosaccharides ne soient désulfatés ou fragmentés. L'usage des matrices liquides ioniques (ILM) pour la MALDI-MS augmente l'intensité des pics, la reproductibilité et les limites de détection [330-336]. Ces ILM sont composées d'une matrice acide cristalline dans laquelle des bases organiques sont ajoutées. Nos collaborateurs ont mis au point une combinaison d'une ILM pour la détection

des HS ou d'Hp [331]. Cette matrice est composée d'un acide cristallin 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA) et d'une base organique 1,1,3,3-tetramethylguanidine (TMG). La détection d'un dodécasaccharide de synthèse avec 12 groupements O- et 6 N-sulfate est possible avec cette matrice [331]. Le spectre MALDI-TOF obtenu est en revanche hautement complexe, probablement du fait d'un certain degré de désulfatation de cet oligosaccharide. Néanmoins, le taux de désulfatation observé avec cette matrice est moindre que celui observé avec les matrices habituellement utilisées pour le MALDI-TOF. De plus, le spectre de masse obtenu démontre un profil de masse spécifique avec des tailles de pic décroissantes correspondant à des désulfatations progressifs de ce dodécasaccharide. Etant donné que, dans notre banque de dp8, nous n'avons aucune idée de la composition des fractions de dp8, ce désulfatation rendra l'analyse difficile.

Le mode d'ionisation par MALDI est le plus souvent associé à un analyseur à temps de vol (TOF), son principe est détaillé dans la figure 42. Les molécules sont caractérisées par un temps de vol qui est converti par un logiciel en ratio m/z en employant l'équation :

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} * t^2$$

avec m la masse de l'échantillon, z la charge de l'échantillon, e la charge élémentaire, U la tension appliquée, L la longueur du tube, t le temps de vol de l'échantillon.

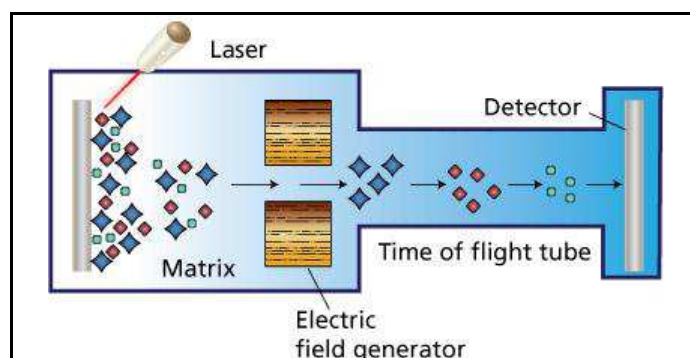


Figure 42 : Principe de la technique MALDI-TOF.

Au niveau de la source, l'échantillon est volatilisé et ionisé après l'impact du laser sur les co-cristaux de la matrice et de l'analyte préalablement déposé sur un support d'acier inoxydable. Les ions sont accélérés par un champ électrique uniforme (U) puis traversent une région libre de champ nommé le tube de vol de longueur L, avec une vitesse constante qui sera inversement proportionnelle au rapport de leur masse sur la charge. Ainsi, les ions les plus chargés et les plus légers vont atteindre le détecteur en premier.

III.2.b. Identification des principaux dp8 présents dans la banque de dp8

Une matrice liquide ionique (ILM) est préparée en mélangeant du 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA) (Sigma[®]) et du 1,1,3,3-tetraméthylguanidine (TMG) (Sigma[®]) avec un ratio molaire 1:2 dans du méthanol. La solution est ensuite soniquée pendant 15 min à 40°C avant d'évaporer le méthanol à l'aide d'un SpeedVac pendant 3 h à température ambiante. Le mélange est ensuite gardé sous vide pendant une nuit. Avant son utilisation, l'ILM est reprise dans du méthanol à une concentration de 70 à 90 mg/mL [331].

La quantité d'échantillon déposée varie : pour le dp8 d'HS non fractionné 0,6 µL d'une solution à 10 mg/mL est employée (correspondant à environ 2,7 nmoles déposées) et pour les différentes fractions de dp8 0,3µL de la solution stock (voir tableau 9 du paragraphe II.1. de la partie « résultats ») est utilisée (correspondant à 0,256 à 1,102 nmoles déposés). Les échantillons sont préparés en mélangeant les différentes solutions de dp8 avec une même quantité de matrice préalablement préparée. Le tout est ensuite déposé sur un support d'acier inoxydable spécifique. L'échantillon déposé est ensuite séché à température ambiante et à pression atmosphérique.

Les analyses par MALDI-TOF-MS sont assurées par le spectromètre de masse Perseptive Biosystems Voyager-DE Pro STR MALDI-TOF (Applied Biosystems[®]) équipé avec un laser UV à nitrogène ($\lambda = 337$ nm) pulsant à 20 Hz. Les spectres sont acquis en mode réflecteur négatif avec une tension d'accélération de -20 kV et un pourcentage de grille de 70 %. L'intensité du laser est fixée à 2700 uma (unités de masse atomique) et 1000 tirs laser par échantillon sont enregistrés avec un délai de 300 ns entre le pulse de laser et l'extraction d'ions. Les spectres sont analysés et transformés avec Data Explorer 4.0 software (Applied Biosystems[®]).

III.3. Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les dp8 par « filter binding assay »

III.3.a. Principe du « filter binding assay »

Une première méthode pour la détermination de l'affinité entre l'IFN γ et la banque de dp8 est le FBA. Cette méthode était à la base utilisée pour mesurer l'affinité entre l'ADN et des protéines. Elle s'est avérée particulièrement adaptée pour des complexes entre des GAG et des protéines. De nombreuses études ont utilisées cette méthode aussi bien pour mesurer l'affinité entre des HS et une protéine spécifique que pour déterminer le type ou la taille des GAG requis pour interagir de façon optimale avec une protéine donnée [309, 337-338]. Dans

notre cas, nous allons utiliser le FBA avec un filtre de nitrocellulose pour séparer la fraction de dp8 liée à l'IFN γ de la fraction de dp8 non complexée. En effet, grâce à la haute affinité de la membrane de nitrocellulose pour les protéines, l'IFN γ est retenu par le filtre mais les dp8 le traversent. Ainsi, seuls les dp8 liés à l'IFN γ sont retenus au travers de cette interaction. Les dp8 liés sont ensuite libérés par l'ajout d'un tampon contenant une forte concentration de sel provoquant la séparation du complexe IFN γ :dp8 (figure 43). Les dp8 liés et non liés sont enfin quantifiés et la constante d'affinité entre l'IFN γ et une fraction de dp8 est enfin déterminée par l'analyse de Scatchard, détaillée en paragraphe II.3.c.

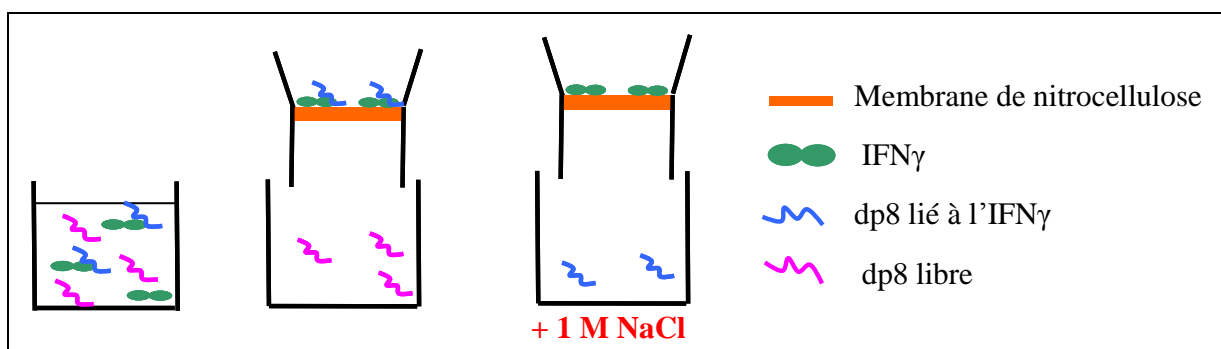


Figure 43 : Schéma du principe du « filter binding assay ».

Après l'incubation de l'IFN γ avec les dp8, les dp8 liés sont séparés des dp8 non liés grâce à une membrane de nitrocellulose. Cette membrane a une haute affinité pour des protéines, elle retient ainsi l'IFN γ . Les dp8 ne sont pas retenus par ce filtre sauf s'ils sont complexés à l'IFN γ . Les dp8 non liés à l'IFN γ sont donc élués avant de libérer les dp8 liés à l'IFN γ par l'ajout d'une solution contenant du NaCl 1 M. La fraction de dp8 liée et non liée est ensuite quantifiée.

Le FBA est donc une méthode simple et facile à mettre en place pour obtenir la constante d'affinité (K_D) entre l'IFN γ et les différentes fractions de dp8. Cependant, la mesure de la concentration des dp8 liés et non liés par mesure d'absorbance à une longueur d'onde de 232 nm est peu précise. En effet, le coefficient d'extinction de la liaison insaturée de l'acide glucuronique (générée par la coupure avec l'Hep III et absorbant à une longueur d'onde de 232 nm) est relativement faible. Par conséquent de faibles concentrations de dp8 ne peuvent pas être mesurées avec précision. C'est pour cette raison que les dp8 seront tous marqués au tritium (^3H). Il est à noter que l'utilisation du matériel radioactif nécessite tout de même quelques précautions particulières.

III.3.b. Marquage des octasaccharides au tritium

Les fractions de dp8 préparées en amont ont été marquées au ^3H suivant le protocole de Vivès *et al.*[339]. En bref, 1 à 2 nmoles des différentes fractions de dp8 ou 20 nmoles du dp8 non fractionné sont dissouts dans 10 μL ou 200 μL du Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 contenant du NaB^3H_4 à 1 mCi ou 20 mCi. Après une incubation pendant une nuit à température ambiante, le pH des échantillons est abaissé à pH 4,0 par l'ajout d'une solution d'acide acétique glaciale avant d'être neutralisé (pH 7,0) par l'ajout d'une solution contenant du NaOH 5 M. La majorité du ^3H non incorporé est évaporée lors de l'acidification de l'échantillon. Les différents dp8 marqués au tritium sont ensuite purifiés sur une colonne PD-10 afin d'enlever le ^3H restant et les sels.

III.3.c. Détermination de la concentration des fractions de dp8 marquées au tritium

La concentration de chaque fraction de dp8 marquées au tritium est déterminée par le kit Blyscan (Biocolor[®]) suivant le protocole indiqué par le fournisseur. Pour cela, la concentration des dp8 marqués au tritium est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage établie avec les dp8 non marqués pour lesquels la concentration exacte est connue. Les dp8 non marqués (0,1 - 0,5 μg) et les dp8 marqués au tritium (2,5 μL) sont incubés pendant 30 min sous agitation avec 100 μL de la solution de colorant. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 10 min à 12 000 rpm avant d'enlever le surnageant. 50 μL du réactif de dissociation sont ajoutés au culot puis le tout est resuspendu. La solution est ensuite centrifugée pendant 5 min à 12 000 rpm avant de mesurer l'absorbance du surnageant à une longueur d'onde de 656 nm.

III.3.d. Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les fractions de dp8 par FBA

Deux μg d'IFN γ (0,294 μM) sont pré-incubés avec différentes concentrations d'oligosaccharides : 0,13-1,5 μM pour les espèces 8.06-8.23 et 0,93- 3,3 μM pour les espèces 8.01-8.05 repris dans 200 μL de tampon contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 7,0. Après une incubation pendant 1 h à température ambiante, les dp8 non liés et liés sont séparés grâce à une membrane de nitrocellulose. Pour cela la membrane est lavée trois fois avec le tampon, avant de déposer le mélange pré-incubé sur la membrane. Les dp8 non liés sont élués par aspiration contrairement aux dp8 liés à l'IFN γ qui sont retenus sur la membrane. La

membrane est ensuite lavée trois fois avec 200 μ L de ce même tampon avant d'être incubée avec ce tampon supplémenté de NaCl à 1 M. Après 30 min d'incubation, le dp8 lié est élué par aspiration et la membrane est lavée trois fois avec ce même tampon contenant du NaCl 1 M.

Une solution de scintillation (1 mL, optiphase Hisafe 3 PerkinElmer[®]) est ajoutée aux fractions de dp8 liés et non liés avant de mesurer leur taux de radioactivité par compteur β de scintillation liquide (Tricarb 2100 TR Packard[®]). Les données sont ensuite traitées par la méthode de Scatchard pour calculer la constante d'affinité.

III.4. Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les dp8 par capteur fluorescent

III.4.a. Principe de fonctionnement du capteur fluorescent

L'interaction d'une protéine avec des GAG ou plus précisément avec des HS est majoritairement basée sur des interactions électrostatiques [340]. Du fait de leur charge, les deux partenaires (protéines et GAG) sont, avant leur interaction, complexés par des contre-ions s'ils se trouvent dans un tampon contenant du sel. Ces contre-ions sont libérés lors de l'interaction de la protéine avec les HS afin de pouvoir établir les interactions électrostatiques. Cet effet est appelé l'effet électrolyte [341-342].

Un capteur fluorescent a été conçu par couplage covalent d'un fluorophore 6-methoxyquinolinium au peptide C-terminal de l'IFN γ . Seul le peptide C-terminal de l'IFN γ est employé puisque le site d'interaction de l'IFN γ pour les HS est uniquement situé dans le domaine C-terminal de l'IFN γ . Le fluorophore quinolinium a la particularité d'être éteint en présence d'ions halogènes mais sa fluorescence s'exalte en l'absence de ces derniers [343-344]. Ainsi, dans le contexte du peptide libre, complexé à des ions chlorures, la fluorescence est minimale. La titration de ce peptide avec les dp8 issus d'HS, libère ces contre-ions, plus l'affinité est grande plus le signal de fluorescence sera intense. Une mesure de l'affinité entre le peptide C-terminal de l'IFN γ et les dp8 est alors possible par une simple mesure de fluorescence [343-344]. Le principe de cette méthode est illustré sur la figure 44.

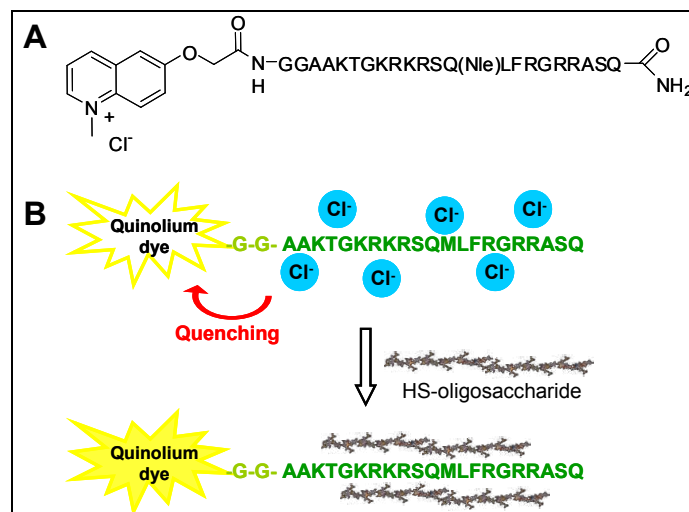


Figure 44 : Principe du capteur fluorescent.

A. Structure du capteur 6-méthoxyquinolinium associé au peptide C-terminal de l'IFN γ (G121- Q143) via le résidu glycine 121. B. Principe du quenching et de l'excitation du fluorophore 6-méthoxyquinolinium lors de l'interaction du peptide avec des oligosaccharides.

III.4.b. Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les fractions de dp8 par l'utilisation d'un capteur fluorescent

Le peptide C-terminal de l'IFN γ (123-143) supplémenté de deux glycines à l'extrémité N-terminale et attaché au fluorophore 6-méthoxyquinolinium est préparé par Marc Nitz de l'université de Toronto comme précédemment décrit Rullo *et al.*, 2010 [344]. Les titrations de dp8 sont faites dans une plaque 96 puits noire à température ambiante contenant du peptide-fluorescent 25 μ M dans 50 μ L de PBS. Des solutions contenant les différentes fractions de dp8 sont préparées à 1-5 mM dans du PBS. Puis chaque dp8 est ajouté à l'IFN γ par fraction de 0,5 μ L. Une titration du tampon dans la solution de l'IFN γ est effectuée pour s'assurer qu'il n'y a pas de photoblanchiment entre les différentes mesures de fluorescence.

Les mesures de fluorescence sont effectuées avant l'ajout du dp8 puis après chaque ajout de dp8 par un lecteur de plaque Tecan[®] infinite M1000 avec longueur d'onde d'excitation de 330 nm et longueur d'onde d'émission de 465 nm. Les résultats expérimentaux sont ajustés avec un modèle d'interaction 1:1 afin de déterminer la constante de dissociation à partir du logiciel Origin comme décrit par Rullo *et al.*, 2010 [344].

III.5. Fractionnement de dp8 par une colonne d'affinité d'IFN γ

III.5.a. Principe de la colonne d'affinité de l'IFN γ

La chromatographie d'affinité retient un analyte par interaction avec un ligand immobilisé sur une résine de la colonne. Dans le cas des interactions protéines-HS, cette méthode est souvent utilisée pour fractionner un ensemble de structures d'HS par affinité pour la protéine [345-346].

Etant donné que le site d'interaction de l'IFN γ pour les HS est uniquement situé dans le domaine C-terminal de l'IFN γ , une colonne d'affinité contenant seulement cette partie de l'IFN γ a été préparée (figure 45.A). Pour cela, une résine Prosep-9CHO a été choisie car elle est composée de billes de verre totalement inerte dotée de pores relativement larges (1000 Å) permettant la diffusion libre des dp8. La streptavidine est immobilisée *via* l'interaction de ses groupements amines primaires avec des groupements aldéhydes activés de la résine. Enfin, le peptide C-terminal de l'IFN γ est immobilisé sur la colonne par son étiquette biotine qui interagit à haute affinité avec la streptavidine préalablement immobilisée.

Les fractions de dp8 utilisées sont celles marquées au tritium afin de diminuer la quantité d'oligosaccharides injectés et ainsi augmenter la capacité séparative de la colonne d'affinité.

III.5.b. Préparation de la colonne d'affinité peptide

Un peptide correspondant au domaine C-terminal de l'IFN γ , comprenant les résidus 123-143, une biotine et un bras espaceur de type polyéthylèneglycol du côté du résidu 123 est synthétisé par Polypeptide[®]. Ce peptide est utilisé pour la préparation d'une colonne d'affinité. Pour cela, 1 g de billes Prosep-CHO 500 Å activées commercialement (Millipore[®]) sont incubées avec de la streptavidine 1 mg dans 3 mL de tampon contenant du Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM, pH 6,8, afin de fixer la streptavidine aux billes par condensation des groupements amines primaires de la streptavidine aux aldéhydes activés des billes. Après 5 h 30 d'incubation à 4°C sous agitation, le surnageant est enlevé et les billes lavées trois fois avec 3 mL de tampon. Ces surnageants de lavage sont mis sur un SDS-PAGE afin d'estimer la quantité de streptavidine non liée aux billes, et calculer le rendement du couplage.

Les sites d'aldéhydes activés libres, non fixés à la streptavidine, sont ensuite réduits par l'ajout du Tris-HCl 50 mM, pH 6,8 pendant 30 min à 4°C, puis les billes sont lavées cinq fois avec le tampon contenant du Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM, pH 6,8. Enfin, les imines formées sont réduites en amines, car ces dernières sont plus stables, par l'ajout du sodium

cyanoborohydryde 50 mM dans un tampon contenant du $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20 mM, pH 6,8, préparé juste avant son utilisation. Après 1 h d'incubation à 4°C sous agitation, le surnageant est enlevé et les billes lavées cinq fois avec 3 mL de tampon.

La quantité maximale de peptide-biotinylé pouvant lier la streptavidine, est calculée *via* la quantité de streptavidine liée. Un excès égal à quatre fois la quantité du peptide-biotinylé par rapport à la streptavidine est incubé avec les billes dans 3 mL de PBS. Après 1 h d'incubation à 4°C sous agitation, le surnageant est enlevé et les billes lavées cinq fois avec 3 mL de PBS. La quantité de peptide-biotinylé libre est ensuite vérifiée par dépôt des surnageants de lavage sur SDS-PAGE et la quantité de peptide-biotinylé attachée aux billes en est déduite.

Les billes contenant le peptide C-terminal de l'IFN γ sont ensuite déposées dans une colonne et la colonne est lavée abondamment avec le tampon contenant du $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20 mM, du NaCl 1 M, pH 7,0 avant d'être équilibrée dans ce même tampon sans NaCl.

III.5.c. Elution des différentes fractions de dp8 par la colonne d'affinité de l'IFN γ

10 000 cpm de différents dp8 préparés (correspondant à des quantités entre 0,03 et 0,17 μg selon les espèces), sont repris dans 100 μL du $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20 mM, pH 7,0 puis déposés sur la colonne d'affinité (1mL). Ces dp8 sont ensuite élués via gravité par l'ajout de solutions salines contenant des concentrations croissantes de NaCl de 0-0,1-0,2 jusqu'à 1 M avec 5 x 1 mL de tampon par concentration de sel. L'éluant est récolté en fraction de 1 mL et la quantité de radioactivité est mesurée après l'ajout de 4 mL de solution scintillante.

III.6. Analyse de l'affinité des différentes fractions de dp8 pour l'IFN γ par CE et CE-MS

III.6.a. Principe de l'électrophorèse capillaire

La CE est une méthode analytique qui sépare des molécules en solution au sein d'un capillaire en fonction de leur charge électrique globale grâce à l'application d'un champ électrique (figure 45). Chaque molécule est alors caractérisée par sa mobilité au sein du capillaire. Les principaux avantages de la CE sont : une faible consommation d'échantillon, une rapidité d'analyse, une possibilité d'automatisation et une résolution élevée.

Depuis le début des années 90, la CE est utilisée pour l'étude des interactions non covalentes, comme par exemple l'interaction des protéines avec des HS [347]. La condition principale

pour que l'étude de ces interactions par CE soit possible, est que la fixation du ligand sur la protéine induise une modification de sa mobilité qui soit quantifiable. Différents modes d'analyse des complexes par CE existent et varient selon l'identité des deux partenaires d'interaction et leur affinité. Dans le cas de l'interaction de l'IFN γ avec les HS, l'affinité est suffisamment importante pour permettre l'électrophorèse de zone par injection directe [348]. Dans cette méthode d'analyse, le ligand (IFN γ) et l'analyte (HS) sont pré-incubés avant d'être injectés dans le capillaire.

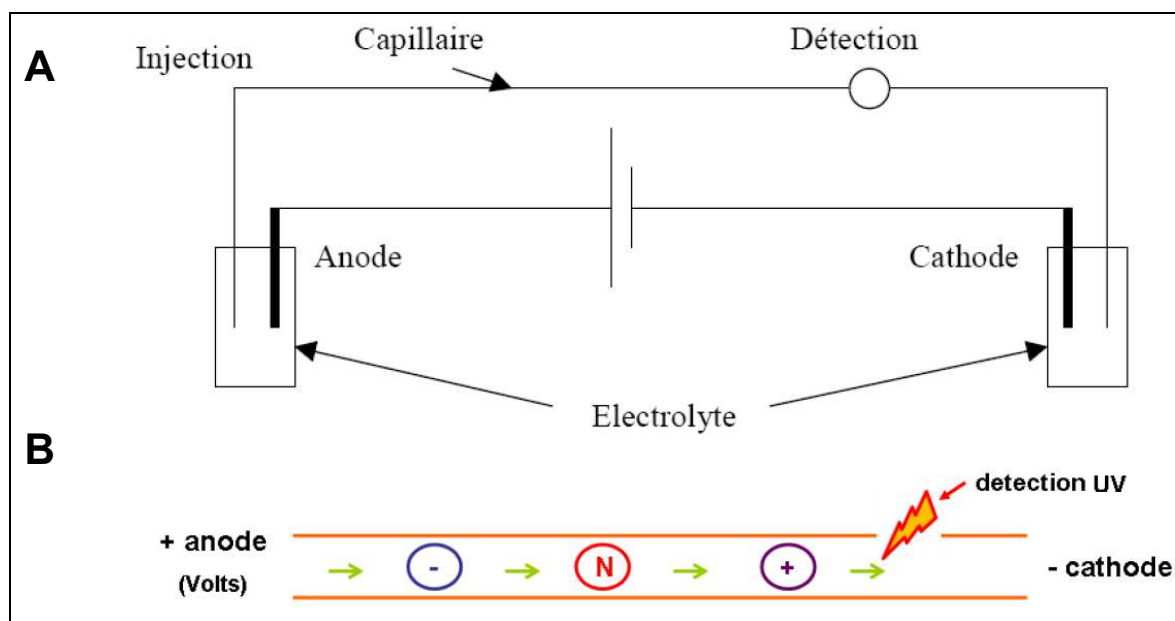


Figure 45 : Principe de la migration des molécules dans l'électrophorèse capillaire.
Schéma représentant le principe de l'électrophorèse capillaire. Un capillaire ouvert à ses extrémités en silice vierge de faible diamètre (50 μm) est utilisé. Ce capillaire est rempli de la même solution d'électrolyte tampon que celle présente dans les deux réservoirs situés de part et d'autre du capillaire. Une différence de potentiel est appliquée aux électrodes créant un champ électrique qui provoque la migration des solutés. **B. Schéma représentant la vitesse de migration des différents solutés dans le capillaire.** Les molécules dans un capillaire rempli de l'électrolyte sont soumises à un champ électrique qui provoque leur migration. Les molécules avec une charge nette positive ont une mobilité supérieure à celles qui ont une charge neutre. Ces dernières sont à leurs tours plus rapides que les molécules ayant une charge nette négative.

- **Injection des échantillons**

Les échantillons sont injectés en mode hydrodynamique où l'application d'une surpression dans le tube contenant l'échantillon provoque l'aspiration de celui-ci. Selon la pression et la durée de la pression appliquée, la quantité d'échantillon aspirée varie et ceci de façon précise et reproductible [349].

- **Séparation des molécules**

La CE permet la séparation des composants d'un mélange en solution *via* la différence de leur vitesse de migration lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique. Toutes les molécules migrent vers la cathode si une tension est appliquée au niveau de l'anode, mais leur temps de

migration varie. Deux forces s'appliquent aux molécules analysées : la force électroosmotique et la force électrophorétique (figure 46). La première force de migration, la force électroosmotique, s'applique aux molécules grâce à l'écoulement de l'électrolyte dans le capillaire et est indépendante des propriétés intrinsèques des molécules injectées [350]. Sa contribution au déplacement des différentes molécules injectées est constante. La deuxième force, la composante électrophorétique, s'applique uniquement aux molécules ayant une charge nette non nulle. Ces molécules migrent grâce au champ électrique appliqué avec une vitesse dépendante de leur charge, leur diamètre mais également de la viscosité de l'électrolyte.

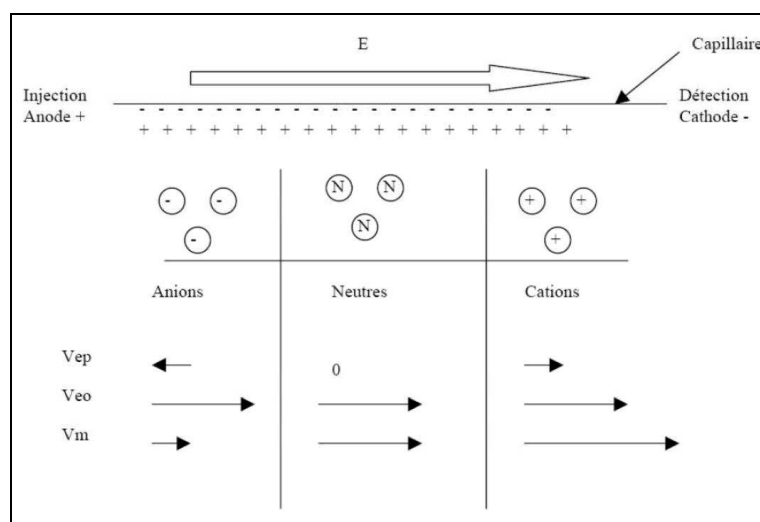


Figure 46 : Forces appliquées aux cations, anions et molécules neutres dans la CE.

Toutes les molécules sont soumises à la mobilité électroosmotique indépendamment de leur charge. Cependant, lorsqu'on applique une tension au niveau de l'anode, les molécules avec une charge nette positive sont accélérées contrairement aux molécules chargées négativement, qui sont ralenties. Les molécules à charge nette neutre ne subissent aucune mobilité électrophorétique. La somme de ces deux effets définira la mobilité nette de l'échantillon à travers le capillaire. Avec V_{ep} la vitesse due aux forces électrophorétiques, V_{eo} la vitesse due aux forces électroosmotique et V_m la vitesse de la molécule migrant dans le capillaire.

- **Greffage d'hydroxypropyl cellulose sur la paroi du capillaire**

Le capillaire de la CE est composé de silice et possède des groupements silanols qui sont chargés négativement au pH du tampon de l'électrolyte utilisé (75 mM acétate d'ammonium, pH 6,5). Ceci entraîne l'adsorption de certaines protéines sur la paroi du capillaire, modifiant ainsi fortement leur migration. Les protéines basiques, dont l'IFN γ , sont particulièrement concernées. Pour palier à ce problème, les capillaires sont greffés avec une molécule neutre, afin de supprimer les charges de la paroi du capillaire. Nos collaborateurs ont précédemment démontré qu'un greffage du capillaire avec de l'hydroxypropylcellulose est optimal pour l'analyse de l'IFN γ . C'est pourquoi nous avons donc utilisé des capillaires ainsi préparés [351].

- **Méthode de détection : absorbance en UV**

Les échantillons analysés par CE sont, dans un premier temps, détectés par l'absorbance en lumière UV. Pour l'IFN γ , il a été démontré que l'absorbance à une longueur d'onde de 200 nm - correspondant à l'absorbance des liaisons peptidiques de la protéine - est la plus sensible. C'est pourquoi nous utiliserons cette longueur d'onde. Le marqueur neutre, l'alcool benzylique, absorbe également à cette longueur d'onde et est ainsi détecté.

- **Méthode de détection : couplage à la spectrométrie de masse**

La MS détermine les masses moléculaires des composants d'un échantillon mais nécessite leur ionisation (détaillée en paragraphe III.2). Lorsqu'un échantillon est analysé par CE-MS, il doit être amené en phase gazeuse, après la séparation de ses composants en phase liquide pendant la CE. L'ionisation par ESI est particulièrement adaptée au couplage CE-MS car elle détecte des molécules de poids moléculaire important - comme certaines protéines - elle est capable de déterminer la masse moléculaire des complexes non covalents et surtout elle ionise l'échantillon à partir d'une phase liquide [352].

L'ESI (figure 47) repose sur la formation d'un spray de gouttelettes chargées qui s'évaporent et provoquent l'expulsion d'ions en phase gazeuse. Elle est produite par l'application d'un champ électrique intense sur un échantillon en solution, introduit à faible débit dans un capillaire métallique. Des microgouttelettes chargées provenant de l'échantillon sortent alors du capillaire sous forme d'un spray. Ce capillaire est entouré d'un tube au travers duquel passe un gaz inerte. Ce gaz aide à l'évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes sortant du capillaire. La densité des charges comprises dans chaque gouttelette augmente jusqu'à l'explosion de ces dernières (quand la répulsion coulombienne égale la tension de surface de la gouttelette). Ce processus se répète et finalement l'échantillon se trouve ionisé en phase gazeuse dépourvu de solvant [353].

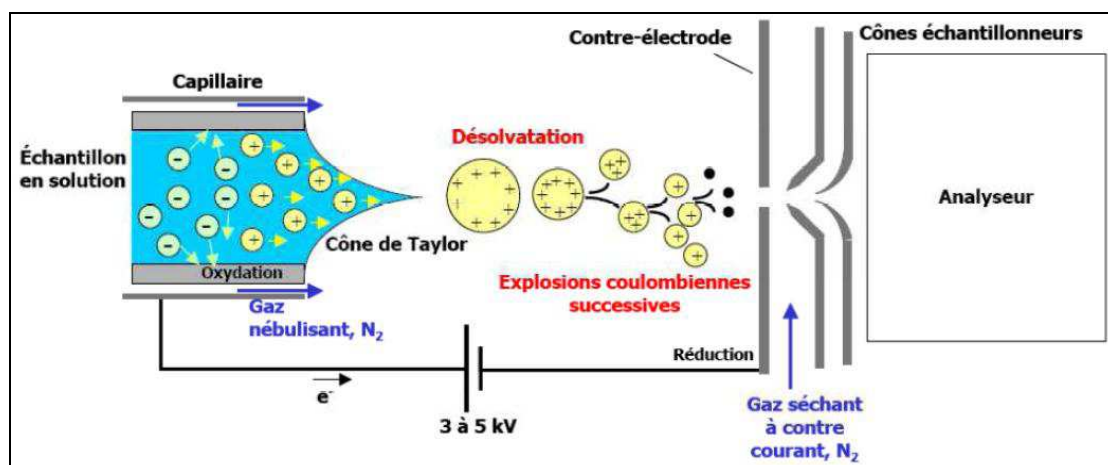


Figure 47 : schéma d'une source par électronébulisation (en mode positif).

Une interface particulière est cependant nécessaire afin de coupler la CE à la MS. En effet, un contact électrique à l'extrémité du capillaire doit, premièrement, être formé permettant la création d'un champ électrique dans le capillaire. Deuxièmement, la jonction doit palier au manque de compatibilité entre le débit de la CE (nL/min) et celui de la MS ($\mu\text{L}/\text{min}$). Pour cela un liquide additionnel est apporté à l'interface augmentant le débit de l'échantillon afin d'être compatible avec le débit nécessaire pour le nébuliseur. Le liquide additionnel a deux rôles supplémentaires : il permet le contact électrique et il favorise l'ionisation des analytes. Selon la composition du liquide additionnel, l'analyse se fait en condition « native » ou « dénaturante ». Dans notre cas, l'analyse en mode « native » est souhaitée puisque nous voulions détecter le complexe IFN γ :dp8. Nos collaborateurs ont déterminé que l'ajout de de l'acétate d'ammonium 20 mM, pH 5,0 à un débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ est optimal pour le couplage CE-MS.

III.6.b. Préparation et greffage du capillaire

Les capillaires utilisés sont des capillaires de silice vierge de diamètre interne de 50 μm (Phymep[®]) qui ont été coupés à la longueur souhaitée par une lame prévue à cet effet. Pour la CE avec détection de l'échantillon par absorbance à une longueur d'onde de 200 nm, un capillaire de 34 cm avec une fenêtre de 5 à 8 mm de longueur située à une distance de 21,5 cm de l'entrée du capillaire a été employé. Pour la CE-MS, un capillaire sans fenêtre de 98 cm a été employé. Aux extrémités et pour la fenêtre du capillaire, la protection en polyimide de ce dernier a été enlevé en le brûlant avec la pointe d'une flamme avant d'être nettoyé avec de l'isopropanol.

Le capillaire a ensuite été greffé par l'hydroxypropylcellulose (HPC). Pour cela, une solution aqueuse de l'HPC 50 mg/mL a été préparée et mise sous agitation pendant 1 h. Elle a ensuite été injectée dans le capillaire à l'aide d'une pousse seringue à un débit de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ jusqu'à l'apparition d'une goutte en sortie du capillaire. Afin de fixer l'HPC de façon covalente, le capillaire a été placé dans un four (à chromatographie de gaz) et mis sous un flux d'azote à une pression de 2 bars avant d'être soumis aux étapes suivantes : un palier de 2 min à 60°C, une augmentation progressive de la température de 5°C/min jusqu'à atteindre 140°C et un palier de 20 min à 140°C [354-355].

Avant l'utilisation d'un nouveau capillaire, celui-ci est rincé à l'eau dans l'appareil à électrophorèse capillaire pendant 15 min en mode « flush » (950 mbar). Cette étape permet d'éliminer le surplus de l'HPC et de vérifier si le capillaire n'est pas bouché. Avant chaque

arrêt supérieur à 2 h, le capillaire est rincé avec de l'eau pendant 10 min en mode « flush » puis les extrémités sont plongées dans de l'eau jusqu'à la prochaine utilisation.

III.6.c. Analyse par électrophorèse capillaire en détection UV

L'appareil à électrophorèse capillaire est un HP^{3D}CE (Agilent Technologies®) dans lequel un cryothermostat LAUDA RE104 régule la température des échantillons. L'acquisition des données et leur analyse a été effectuées par le logiciel ChemStation. Tous les paramètres de l'injection et du mode d'analyse des échantillons sont détaillés dans le tableau 4.

Les mobilités électrophorétiques sont déterminées à partir des relations suivantes :

- Mobilité électroosmotique : $\mu_{eo} = \frac{L.l}{U.t_{MN}}$
- Mobilité apparente : $\mu_{app} = \frac{L.l}{U.t}$
- Mobilité électrophorétique : $\mu_{ep} = \mu_{app} - \mu_{eo}$

avec L la longueur totale du capillaire (cm), l la longueur effective du capillaire (cm), c'est-à-dire la longueur entre l'entrée du capillaire et le détecteur, U la tension appliquée (V), t_{MN} le temps de migration du marqueur neutre (s), t le temps de migration de l'échantillon (s).

Les échantillons analysés sont soit l'IFN γ seul (15 μ M dans le tampon de séparation), soit l'IFN γ en solution avec les fractions de dp8 ou le mélange de dp8 non fractionnés. Pour les mélanges, 15 μ L d'une fraction de dp8 soit de dp8 non fractionnés à 30 μ M ont été ajoutés, au goutte à goutte, à partir de 15 μ L d'une solution d'IFN γ à 30 μ M, le tout dans le tampon de séparation. Après une heure d'incubation à température ambiante, les échantillons sont analysés en triplicata par la CE. Un marqueur neutre, l'alcool benzylique (dilué à 1/10 000 dans le tampon de séparation) a simultanément été injecté.

III.6.d. Analyse par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse

Les échantillons analysés par CE-MS sont soit l'IFN γ seul (20 μ M dans le tampon de séparation), soit l'IFN γ en solution avec les fractions de dp8 soit le mélange de dp8 non

fractionnés. Pour les mélanges, 15 µL d'une fraction de dp8 ou de dp8 non fractionnés à 40 µM ont été ajoutés, au goutte à goutte, à partir de 15 µL d'une solution d'IFN γ à 40 µM, le tout dans le tampon de séparation. Un mélange contenant seulement du dp8 non fractionné 2 µM et de l'IFN γ 20 µM a également été analysé. Après une heure d'incubation à température ambiante, les échantillons sont analysés par CE-MS.

Pour le couplage de la CE à la MS une interface coaxiale à trois voies a été employée (G1607A, Agilent Technologies®). Le tampon de séparation de la CE (NH₄Ac 75 mM, pH 6,5) est un tampon volatile, compatible au couplage à la MS. Du liquide additionnel (NH₄Ac 20 mM, pH 5,0) a été apporté par un pousse seringue à 3 µL/min afin de rendre le débit de la CE compatible avec celui de la MS. L'appareil du MS employé est un Esquire 3000+ (Bruker®) qui est un électrospray avec un analyseur à trappe ionique quadripole. Le mode de gamme de masse a été fixé en mode étendu (200 à 6000 m/z) avec une masse ciblée de 3000 m/z. La pression du gaz de nébulisation a été fixée à 5 psi et le débit et la température du gaz de séchage à 3 µL/min et 150°C. L'acquisition des données et leur analyse sont effectuées par le logiciel Bruker Daltonic DataAnalysis version 5.1. Tous les paramètres d'injection et de mode d'analyse des échantillons par CE-MS sont détaillés dans le tableau 4 ci-dessous.

	CE	CE-MS
Température	25°C	25°C
Tampon de séparation	NH ₄ Ac 75 mM, pH 6,5	NH ₄ Ac 75 mM, pH 6,5
Conditionnement (en mode "flush 950 mbar)	1 min d'eau 2 min tampon de séparation	1 min d'eau 2 min tampon de séparation
Injection hydrodynamique	Echantillon : 20 s, 50 mbar Tampon : 2 s, 30 mbar Marqueur neutre : 5 s, 50 mbar Tampon 2 s, 30 mbar	Echantillon : 60 s, 50 mbar Tampon : 2 s, 30 mbar
Tension appliquée	+ 8 kV	+ 8 kV
Détection UV	200 nm	-
Pression appliquée	15 mbar	50 mbar
Temps d'analyse total	30 min	40 min

Tableau 4: Conditions d'analyse du CE et CE/MS.

IV. Cristallisation

IV.1. Principe de la résolution d'une structure par cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X permet la détermination de la position de chaque atome présent dans le cristal. Différentes étapes sont nécessaires avant de résoudre la structure du cristal. Elles sont détaillées sur la figure 48 [356].

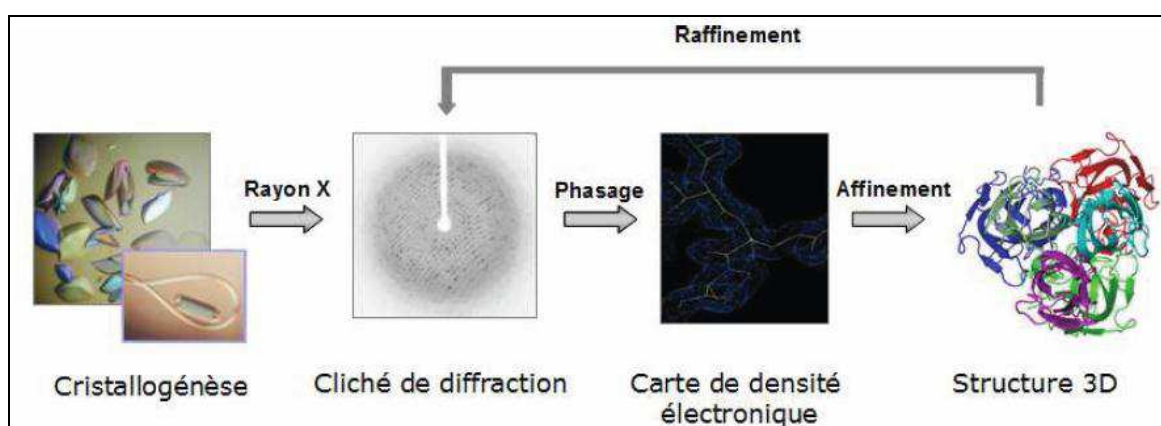


Figure 48 : Représentation des différentes étapes pour l'obtention de la structure d'une protéine par cristallographie aux rayons X.

IV.1.a. Pourquoi faut-il un cristal pour résoudre la structure par rayons X?

La formation d'un cristal est primordiale pour la détermination de la structure d'une molécule par cristallographie aux rayons X car dans un cristal les molécules sont empilées d'une façon périodique et régulière. Ceci est essentiel puisqu'une protéine en solution diffuse les ondes incidentes avec une très faible intensité et l'orientation de ces différentes ondes diffusées interfèrent de façon destructive. Cette diffusion d'ondes ne permet pas l'acquisition d'un cliché de diffraction. Dans un cristal, le nombre de molécules est considérable ($> 10^{15}$) et elles ont toutes la même orientation. La diffusion des rayons X est alors plus grande et l'interférence constructive. Par conséquent, le cliché de diffraction est ordonné et plus intense. Si la résolution de ce cliché est suffisamment élevée, elle permet l'extraction des éléments nécessaires pour déterminer la structure de la protéine (ou du complexe). De plus, du fait de l'état cristallin de la protéine, la destruction de celui-ci par les rayons X est limitée car elle est partagée entre les protéines constituant le cristal.

IV.1.b. La cristallogenèse

La cristallogenèse est le passage d'un état liquide dans lequel les molécules sont désordonnées vers un état solide spécifique où elles sont entièrement ordonnées dans un réseau cristallin. Afin d'avoir un cliché de diffraction, avec lequel la structure de la protéine cristallisée peut être déterminée, le cristal doit être régulier et avoir des faces et des angles bien définis. L'obtention d'un tel cristal est souvent la barrière à la résolution de la structure [356-357].

La cristallisation peut être divisée en trois étapes : la nucléation, la croissance et l'arrêt de la croissance du cristal [356]. Le diagramme de phase permet de visualiser ce processus (figure 49). Il est important d'atteindre, par concentration graduelle de la protéine, l'état de supersaturation où la nucléation peut avoir lieu, sans pour autant tomber dans la zone de précipitation. Il est à noter que les conditions de cristallogenèse varient pour chaque protéine. Certains adjuvants peuvent favoriser la cristallisation de la protéine telle que certains sels ou certains polyéthylèneglycoles (PEG). Cependant, la température, le tampon et le pH interviennent également dans ce processus.

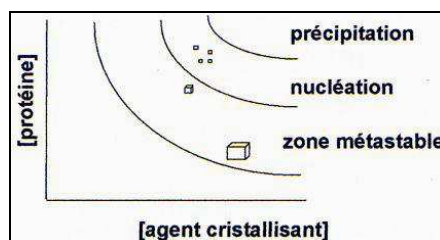


Figure 49 : Diagramme de phase d'une protéine.

Ce diagramme de phase démontre la relation entre la concentration d'agent précipitant et la concentration de la protéine. La protéine doit se concentrer afin d'atteindre l'état de supersaturation où la nucléation est probable sans pour autant rentrer dans l'état de précipitation.

Différentes techniques de cristallogenèse existent. Nous avons utilisé la méthode par diffusion de vapeur avec goutte assise puisqu'elle est la mieux adaptée à l'automatisation (figure 50). Dans cette méthode, une goutte de protéine est mélangée aux agents précipitants, présents à plus faible concentration que leur concentration dans le réservoir. Cette goutte se trouve à proximité du réservoir contenant ces mêmes agents précipitants. Du fait de la différence de concentration d'agents précipitants entre la goutte et le réservoir, le solvant, dans notre cas de l'eau, contenu dans la goutte s'évapore. Lorsque l'équilibre de la concentration d'agents précipitants entre la goutte et le réservoir est atteint, l'évaporation s'arrête. Ce processus entraîne l'augmentation graduelle de la concentration de la protéine. Si les conditions (pH,

tampon, concentration de la protéine, type et concentration d'agents précipitants) sont favorables, la protéine peut cristalliser.

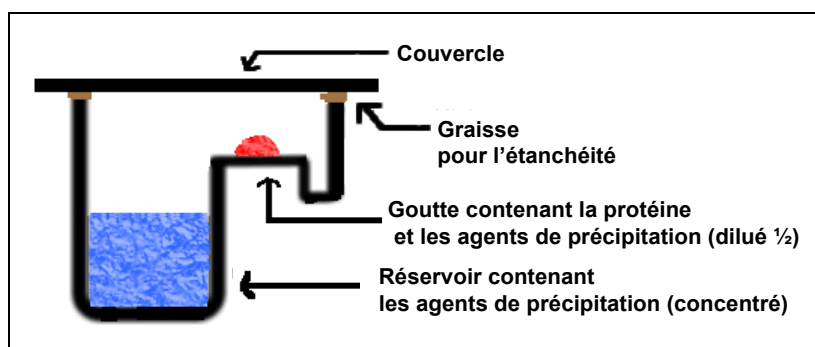


Figure 50 : Systhème de cristallisation par diffusion de vapeur avec goutte assise.

De nombreux kits sont aujourd'hui commercialisés pour cribler la condition de cristallogénèse d'une protéine. De plus, la miniaturisation et l'automatisation nous a permis de tester de nombreuses conditions de façon simultanée avec une quantité de protéine restreinte. En effet, environ 600 conditions ont été testées en parallèle avec une utilisation de seulement 110 μ L de protéine ou du mélange protéine/oligosaccharide.

IV.1.c. Simulation du désordre par le logiciel IUPred de l'IFN γ

Une protéine cristallise plus facilement si celle-ci à une structure tridimensionnelle ordonnée. Afin de prédire le désordre structural d'une protéine de nombreuses méthodes de prédiction existent. Celles-ci peuvent être divisées en trois classes : (1) celles prenant en compte uniquement la séquence d'acides aminés de la protéine (ab-initio), (2) celles comparant les séquences d'acides aminés des protéines similaires, ayant des structures connues, avec la séquence d'acide aminés de la protéine en question (Template based) puis (3) celles moyennant les prédictions de désordre de différents serveurs, enlevant ainsi les prédictions inexact (Meta) [358].

Nous avons choisi la méthode IUPred [359-361] qui est une méthode ab-initio prenant donc en compte uniquement la séquence primaire de la protéine. Le désordre de chaque acide aminé d'une protéine est estimé par la capacité de cet acide aminé de former des contacts stabilisants avec un acide aminé proche de celui-ci. Cette capacité de former des contacts interrésiduels est en effet proportionnelle à la probabilité de ce résidu d'être structuré puisque pour qu'une protéine forme une structure tridimensionnelle, de nombreux contacts

interrésiduels doivent être formés afin de compenser la perte d'entropie pendant le repliement de la protéine.

IV.1.d. La cristallogénèse d'un complexe

Lorsqu'on souhaite résoudre la structure d'un complexe par cristallographie aux rayons X, deux techniques existent. La première, le « trempage » consiste en la formation du cristal de la protéine dans les conditions préalablement déterminées, avant de tremper le cristal dans une solution contenant le ligand [362]. Celui-ci doit diffuser librement dans le cristal et doit interagir avec la protéine cristallisée. Cette méthode est facile à mettre en place si les conditions de cristallisation de la protéine sont connues. Cependant, dans le cas de l'IFN γ , elle n'est pas adaptée puisque les conditions de cristallisation de l'IFN γ ne sont pas compatibles avec celles de la formation du complexe [36, 38, 363-365]. En effet, l'agent précipitant est le sulfate d'ammonium, ce sel présent à concentration élevée, empêche l'interaction de l'IFN γ avec les oligosaccharides de type Hp.

La seconde solution est la « co-cristallisation ». Dans ce cas, la protéine et le ligand sont pré-incubés avant d'être soumis aux tests de cristallogénèse. Nous avons employé cette méthode pour cribler les conditions de cristallisation compatibles avec ceux de la formation du complexe.

IV.1.e. La récupération des cristaux et leur congélation

Les cristaux formés sont ensuite récupérés à l'aide d'une boucle spécifique permettant d'orienter un seul cristal de façon optimale dans le faisceau des rayons X. Il est important de congeler les cristaux puisque les rayons X génèrent des radicaux libres qui détruisent ces derniers. La congélation limite la diffusion des radicaux au sein du cristal et restreint ainsi sa destruction [366]. Généralement, les cristaux sont plongés, avant leur congélation, dans une solution cryoprotectrice (PEG, glycérol, ...) afin d'empêcher la formation des cristaux de glace autour du cristal détruisant celui-ci.

IV.1.f. *Du cliché de diffraction à la résolution de la structure*

Les différentes étapes entre l'obtention du cliché de diffraction jusqu'à la résolution de la structure ne seront que brièvement illustrées.

Après la récupération et la congélation des cristaux, ceux-ci sont placés dans un faisceau de rayons X monochromatiques. Nous avons employé la ligne ID29 du synchrotron de l'ESRF, qui est une ligne à haute intensité. Elle a également l'avantage de disposer d'un microdiffractomètre (MD2) réduisant le diamètre du faisceau des rayons X (jusqu'à 10 μm). Ceci nous a permis d'orienter le faisceau de façon précise afin de ne cibler que le centre d'un seul cristal malgré la taille réduite de ce dernier (avec une dimension maximale de 30 μm). Les rayons X frappent alors le cristal et grâce à son organisation régulière, les ondes réfléchies interfèrent de façon constructive. L'enregistrement des ces ondes réfléchies s'appelle un cliché de diffraction et contient toutes les informations structurales du cristal. Selon la qualité de ce dernier, les informations structurales obtenues sont plus ou moins détaillées.

L'intégration, l'indexation et la mise à l'échelle des clichés de diffraction sont aujourd'hui automatisés par l'emploi de divers logiciels et ne seront pas détaillées dans ce manuscrit. Un problème perpétuel réside désormais dans la perte des phases lors de l'acquisition des clichés de diffraction. Ces phases sont néanmoins nécessaires pour corrélérer l'intensité des tâches de diffraction à la densité électronique du cristal. Elles sont de cette manière essentielles pour le calcul de la structure. Cependant, pour la cristallisation de l'IFN γ en complexe avec des oligosaccharides, cette perte de phase ne pose pas de problème étant donné que la structure de l'IFN γ a été résolue [36]. Effectivement, les phases de notre cliché de diffraction pourront facilement être calculées par remplacement moléculaire avec la structure de l'IFN γ déjà résolue. Une fois ces phases acquises, la structure peut être calculée et affinée par des logiciels spécifiques. Des facteurs tels que le facteur cristallographique R et le facteur R_{free}, permettent d'évaluer l'exactitude de la structure calculée par rapport au cliché de diffraction obtenu. En effet, le facteur R indique l'accord entre le modèle cristallographique et les données obtenues par diffraction [367]. Le facteur R_{free}, quant à lui, représente le degré avec lequel le modèle prédit les données (5 à 10 %) qui n'ont pas été inclus dans le processus de l'affinement [368].

IV.2. Préparation du complexe

IV.2.a. Préparation de l'IFN γ et des oligosaccharides employés

L'IFN γ est préparé comme décrit dans le paragraphe I.1 et I.2 dans un tampon contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 6,8 à une concentration de 295,7 μ M.

Des oligosaccharides de synthèse - produits par le Laboratoire de Chimie Organique Multifonctionnelle du Dr. Bonnaffé à l'université de Paris sud - sont employés et préparés comme décrit dans Lubineau *et al.*, 2004 [321] et Dilhas *et al.*, 2008 [287, 321]. Ils sont repris à 946,38 μ M dans du Tris-HCl 20 mM, pH 6,8.

IV.2.b. Pré-incubation du complexe

La solution d'oligosaccharide est ajoutée goutte à goutte à celle d'IFN γ jusqu'à atteindre un rapport molaire final d'IFN γ :oligosaccharide de 1,2:1 pour le dp4 et le dp6 et de 1:1,25 pour le dp8. Les mélanges sont centrifugés pendant 5 min à 12 000 rpm avant les essais de cristallogenèse.

IV.3. Criblage des conditions menant à la cristallisation du complexe

IV.3.a. Tests initiaux de cristallisation

Les tests initiaux de cristallisation (température, pH, tampon et agents de précipitation) sont réalisés par un nano-robot au sein du HTXlab au PSB de Grenoble [369]. Cet instrument permet d'examiner rapidement de nombreuses conditions de cristallogenèse grâce aux plaques de cristallisations commerciales. Six plaques de 96 puits (commercialisées par Qiagen[®] et Hampton[®]) ont été testées, avec des gouttes composées de 100 nL de la solution du complexe mélangées avec 100 nL de la solution contenant l'agent précipitant. Les plaques sont maintenues à 20°C et visualisées avec un système d'imagerie par microscopie RoboDesign Minstrel III (Rigaku[®]).

IV.3.b. Optimisation des conditions de cristallisation

Dans les 600 conditions testés, une dizaine ont été affinées en mélangeant 1 μL de mélange IFN γ -oligosaccharide à 1 μL de solution contenant l'agent précipitant. Six conditions ont été affinées sur deux plaques de 96 puits caractérisées par des variations du pH, de la concentration de sel et de la concentration d'agent précipitant.

IV.4. Diffraction des cristaux

Une fois les cristaux obtenus, il est nécessaire de les cryo-protéger avant de les soumettre aux rayons X. Pour ce faire, 2 μL de tampon de cryo-protectant, contenant du PEG 400 30 %, sont ajoutés à la goutte contenant les cristaux avant de les monter dans une boucle spécifique. Le tout est ensuite rapidement congelé en plongeant la boucle dans l'azote liquide.

Les cristaux sont orientés dans le faisceau du synchrotron de la ligne ID29 avant d'être soumis aux rayons X. Cette ligne est équipée avec un microdiffractomètre (MD2) permettant la réduction du diamètre du faisceau jusqu'à 10 μm . Cette réduction du faisceau des rayons X a été employée pour centrer le faisceau sur le cristal. Un détecteur Pilatus 6M-F, présent sur la ligne ID29 du synchrotron de l'ESRF, a permis l'enregistrement des clichés de diffraction. La diffraction d'un seul cristal, avec la condition contenant de l'IFN γ et du dp4, a permis l'indexation du cristal. Ceci a été fait de façon automatique par le logiciel EDNA. Le nombre de dimères par maille a été évalué par le Matthews Probability Calculator [370-371] avec une taille de la maille de 138 Å - 138 Å - 158 Å, une l'angle γ à 120°C et une masse moléculaire de 35 304 Da, comprenant un dimère de l'IFN γ et un dp4.

Rôle du domaine C-terminal de l'IFN γ dans l'interaction avec les HS et l'IFN γ R

Ce chapitre décrit le travail que nous avons effectué pour analyser les domaines de l'IFN γ impliqués dans la reconnaissance des HS et de l'IFN γ R. Les résultats obtenus ont donné lieu à la rédaction d'un article, soumis pour publication :

The characterization of the IFN γ -Heparan Sulfate binding reveals that two amino acid basic clusters do not similarly contribute to the interaction and oppositely regulate the cytokine activity.

Els Saesen, Stéphane Sarrazin, Cédric Laguri, Anne Imberty, Rabia Sadir, Hugues Lortat-Jacob

RESULTATS

I. Rôle du domaine C-terminal de l'IFN γ dans l'interaction avec les HS et le IFN γ R

L'IFN γ reconnaît deux molécules à la surface des cellules : un récepteur de signalisation, l'IFN γ R et les HS. Des travaux précédents [46, 78-80, 82, 277, 317, 322-324] ont montré que le domaine C-terminal de la cytokine était extrêmement important pour ses fonctions biologiques du fait que cette partie interagissait à la fois avec les HS et avec le récepteur de la cytokine. L'identification des résidus jouant un rôle dans l'interaction avec les HS n'a été démontrée que de façon indirecte par l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de peptides correspondants aux différentes parties du domaine C-terminal de l'IFN γ [87, 314, 317, 319, 372]. C'est également par ces méthodes que l'importance du domaine C-terminal dans l'interaction avec le récepteur a été démontrée car cette partie, *a priori* désordonnée, est non-visible dans la structure cristallographique de l'IFN γ ou du complexe IFN γ :IFN γ R α [39, 47, 80, 372].

L'interaction IFN γ :HS permet l'élimination plasmatique de la cytokine et sa concentration tissulaire dans des zones spécifiques [316, 318, 372]. De plus, un mécanisme de régulation de la signalisation de la protéine entre en jeu, mettant en œuvre différentes formes tronquées du côté C-terminal de l'IFN γ . En effet, ces différentes formes sont retrouvées *in vivo*. Celles pour lesquelles seuls quelques résidus (jusqu'à 7 AA) manquent ont une activité accrue, en revanche la perte d'AA supplémentaires anihile complètement l'activité de l'IFN γ . L'interaction avec les HS semble promouvoir une protéolyse partielle (perte du domaine D2 mais pas du domaine D1) augmentant ainsi l'activité de la cytokine. Cependant, le mécanisme de cette protection partielle n'est pas encore compris à ce jour [46, 77-79]. Une connaissance détaillée du mécanisme de l'interaction entre l'IFN γ et ses deux partenaires pourra aboutir à la compréhension du rôle des HS dans le fonctionnement de l'IFN γ et plus particulièrement de la partie C-terminale de ce dernier.

Pour cela, nous avons voulu caractériser l'importance de chaque résidu basique du domaine C-terminal de l'IFN γ dans l'interaction avec les HS et le récepteur. La méthode la plus utilisée et la plus directe est la mutagenèse dirigée dans laquelle les résidus basiques sont mutés en résidu neutre [373-376]. Étant donné que la partie C-terminale de l'IFN γ n'est pas

structurée et éloignée du corps protéique, ces mutations ne devraient pas changer la conformation tridimensionnelle de l'IFN γ [40]. Après la conception et la purification de ces mutants, nous analyserons leur interaction avec le récepteur et les HS par différentes techniques : RMN, ITC et SPR. Finalement, nous déterminerons l'activité biologique de ces mutants en vue de les corrélés avec les résultats des tests d'interaction par SPR.

I.1. Purification de l'interferon gamma WT

I.1.a. Le choix du système d'expression

Avant de commencer l'expression et la purification d'une protéine, le système d'expression doit être choisi. Dans le cas de l'IFN γ , nous avons opté pour l'expression en système bactérien. Il a de nombreux avantages dont la disponibilité de nombreuses souches et vecteurs adaptés à l'expression des protéines recombinantes, une croissance rapide ainsi qu'une densité cellulaire importante. Cependant, les protéines exprimées dans ce système d'expression sont dépourvues de leur glycosylation si celles-ci sont présentes. Les glycosylations de l'IFN γ n'étant pas nécessaires pour son activité, leur présence n'est donc pas essentielle. Un inconvénient supplémentaire potentiel de ce système d'expression est que les protéines recombinantes s'agrègent dans des corps d'inclusion (CI). Lorsque les bactéries produisent une protéine en grande quantité, ces protéines peuvent précipiter à cause d'un mauvais repliement. Ceci est probablement dû au changement du microenvironnement (pH, osmolarité,...) ou à une variation du mécanisme de repliement parfois attribué à l'absence de certaines chaperones. L'IFN γ est en effet produit dans ces CI. Le problème majeur, si une protéine s'aggrave dans les CI, est la recherche - souvent très laborieuse - des conditions de repliement *in vitro* afin de renaturer la protéine recombinante de façon correcte pour que la protéine soit active. En revanche, ces CI sont faciles à purifier et les protéines sont produites en grande quantité et protégées des protéases.

Des bactéries *E.coli BL21 (star) DE3* ont été choisies pour l'expression de l'IFN γ . Tout d'abord, elles sont compatibles avec les vecteurs « pET ». Elles sont mutées au niveau du gène codant pour le *rne* - ce qui empêche la dégradation des ARNm - et elles ne contiennent pas les protéases *lon* et *OmpT* - ce qui diminue la dégradation des protéines recombinantes produites -. Enfin, elles sont chimiquement rendues compétentes.

Après le choix du système d'expression, le vecteur doit être choisi. L'IFN γ est produit par l'utilisation d'un vecteur pET11a (figure 51). Les vecteurs « pET » sont spécifiquement

conçus pour la production des protéines recombinantes dans *E.coli*. Leur expression est sous le contrôle d'un promoteur T7-ARN-polymérase de bactériophage et est induite par l'ajout de l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) déclenchant l'expression de la T7-ADN-polymérase. La protéine recombinante peut ainsi représenter jusqu'à 50 % du contenu protéique de la bactérie après seulement quelques heures d'induction. D'autre part, ce vecteur contient un gène de résistance à l'ampicilline, le gène codant pour le *LacI*, des sites de coupure aux différentes enzymes de restrictions ainsi qu'un codon T7 transcription start et stop.

Pour finir, le gène codant pour l'IFN γ est adapté aux codons utilisés par *E.coli* en évitant des codons rares.

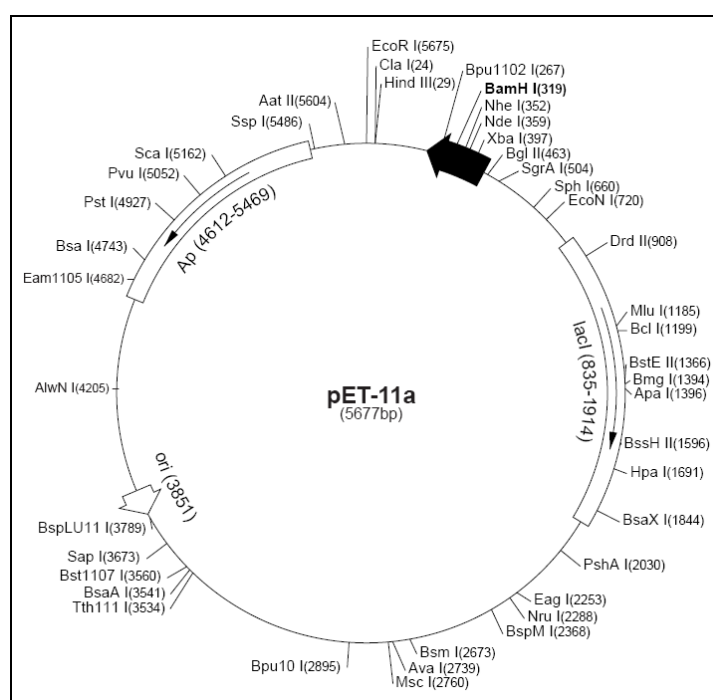


Figure 51 : Carte du vecteur pET11a.

Le vecteur d'expression pET11a contient le gène codant pour la résistance à l'ampicilline, le gène codant pour le *lacI*, des multiples sites de coupure aux enzymes de restrictions ainsi que le codon du T7 transcription start et stop.

D'après Novagen[®].

I.1.b. Purification de l'IFN γ WT

- **Expression de l'IFN γ**

L'IFN γ est exprimé et purifié comme décrit par Sarrazin *et al.* en 2005 [320]. Des bactéries *E.coli* BL21 (*star*) DE3 sont transformées par un vecteur pET11a contenant gène codant pour l'IFN γ WT. Les bactéries transformées sont sélectionnées par le gène codant pour la résistance à l'ampicilline présent dans ce vecteur. La purification s'effectue généralement à partir d'une

culture bactérienne d'un litre de milieu LB (lysogeny broth) induit pendant 5 h avec 0,5 mM IPTG. L'IFN γ est exprimé dans les CI qui sont récupérés après lyse des bactéries (par presse de French) puis lavés. Ces étapes de lavage permettent de séparer les CI d'autres constituants bactériens parmi lesquels on retrouve entre autres les membranes, également présentes dans le culot après la lyse. L'analyse par SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), illustrée sur la figure 52, montre que l'IFN γ est fortement purifié dès cette étape. Les CI sont solubilisés en totalité dans du chlorure de guanidinium 6 M, un sel chaotrope. Il est à noter que l'IFN γ se renature spontanément par dilution de 2,4 à 0,2 mg/mL d'IFN γ dans du chlorure de guanidinium 0,5 M. Ces conditions de repliement étaient déjà acquises au sein du laboratoire.

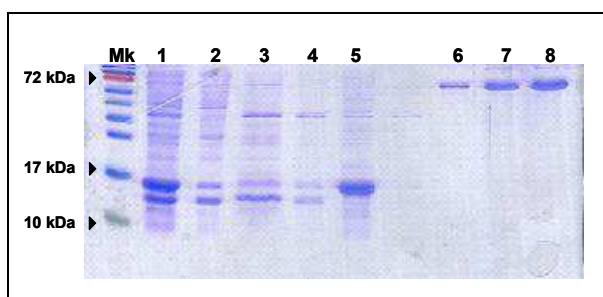


Figure 52 : Suivi de l'expression et des lavages des CI (SDS-PAGE).

Dans chaque puit l'équivalent de 30 μ L de culture est déposé. (1) Bactéries induites pendant 5 h, (2-4) Surnageant des étapes de lavage des CI, (5) CI repris dans un tampon de lyse, (6) 1 μ g BSA, (7) 5 μ g BSA, (8) 10 μ g BSA. La concentration de l'IFN γ présente dans les CI après les étapes de lavage est estimée à 1 mg/mL.

- **Purification de l'IFN γ replié.**

L'IFN γ replié est alors chargé sur une colonne échangeuse de cations forts : une Mono S contenant des groupes sulphonates. Il est élué par un gradient de NaCl et le pic observé vers 0,5 M de NaCl correspond à l'IFN γ . Peu de contaminants sont présents lors de cette étape, cependant une filtration sur gel est tout de même effectuée. L'utilisation d'une colonne Superdex 75 permet la séparation des protéines avec des masses moléculaires entre 1 et 100 kDa. Une amélioration de la pureté est ainsi obtenue, tout en éliminant le sel. Lors de cette filtration sur gel, l'IFN γ est élué comme une protéine de masse moléculaire plus petite que celle attendue. Ceci est dû au fait que le tampon dans lequel l'IFN γ est le plus stable pour la congélation (Tris-HCl 20 mM, mannitol 25 mg/mL, pH 6,8) ne contient pas de sel (illustré sur la figure 53). Du fait de l'absence de sel, l'IFN γ interagit de façon non spécifique avec la matrice et est donc légèrement retenu. La filtration sur gel de l'IFN γ WT utilisé pour les expériences de microcalorimétrie se fait en tampon PBS, dans ce cas l'IFN γ est élué dans un volume d'élution correspondant à sa masse moléculaire.

Un rendement de 20 mg d'IFN γ par litre de culture est obtenu en moyenne. L'intégrité de la protéine est vérifiée par spectrométrie de masse et la concentration exacte est déterminée par dosage d'AA.

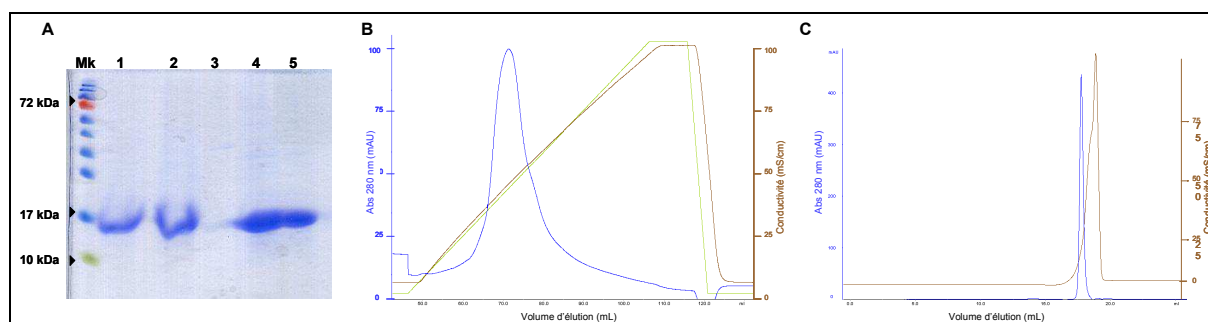


Figure 53 : SDS-PAGE et Chromatogrammes de la purification de l'IFN γ .

A. SDS-PAGE de la solubilisation et du repliement de l'IFN γ . Dans chaque puits l'équivalent de 300 μ L de culture est déposé. (1) CI solubilisés dans du Gd/HCl 6 M, (2) Surnageant de la solubilisation, (3) Fraction non-solubilisée (culot), (4) Fraction repliée (surnageant et culot), (5) Fraction correctement repliée (surnageant) **B. Colonne Mono S.** L'IFN γ absorbé sur la colonne est élué par un gradient de sel de 0 à 1 M dans un tampon contenant du Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6,8. Les protéines éluées avec 0,3-0,4 M de NaCl sont analysées par SDS-PAGE puis purifiées par filtration sur gel et correspondent à l'IFN γ WT. **C. Filtration sur gel sur une colonne Sephadex.** L'IFN γ est élué avec un tampon contenant du Tris 10 mM, du mannitol 25 mM pH 6,8.

I.2. Identification des résidus impliqués dans l'interaction par RMN

La RMN est une technique puissante pour l'étude d'interactions protéine-ligand et est largement utilisée pour l'étude d'interactions entre des protéines et des oligosaccharides dérivés d'Hp [3-5]. On peut observer l'importance de chaque résidu de l'IFN γ dans l'interaction avec l'Hp ou les HS en enregistrant les changements des déplacements chimiques (ou fréquences) lors de l'interaction. En effet, le déplacement chimique de chaque noyau actif en RMN (¹H, ¹⁵N ou ¹³C) dépend de son environnement électronique. L'IFN γ est marqué ¹⁵N et ¹³C lors de son expression dans un milieu contenant seulement du ¹⁵N et du ¹³C comme sources d'azote et de carbone respectivement. Le marquage isotopique de l'IFN γ permet d'enregistrer des expériences multidimensionnelles qui permettent l'attribution des fréquences associées à un AA donné mais aussi d'enregistrer des expériences de corrélation ¹H-¹⁵N permettant de visualiser rapidement les fréquences des protons amides de chaque AA en fonction de l'ajout d'un ligand.

Lorsque l'IFN γ interagit avec l'Hp, l'environnement électronique des résidus à proximité du site d'interaction change de même que leur déplacement chimique. Les résidus ayant un changement significatif du déplacement chimique sont donc identifiés pour leur implication dans l'interaction avec l'Hp. Cette méthode a l'avantage de ne pas changer la structure de l'IFN γ par l'ajout des étiquettes ou par des mutations. Des oligosaccharides de différentes

tailles (dp2, dp4 et dp8) et totalement sulfatés [Δ hexA2S-GlcNS,6S-(IdoA2S-GlcNS,6S) $_n$ dp2 n=0, dp4 n=1 et dp8 n=3) issus de l'Hp sont titrés dans une solution d'IFN γ tout en enregistrant le déplacement chimique de ce dernier. Ces expériences ont été faites en collaboration avec Cédric Laguri de notre laboratoire. L'histogramme des variations du déplacement chimique pour chaque résidu, illustré sur la figure 54, démontre que la partie C-terminale de l'IFN γ est impliquée dans l'interaction. Plus spécifiquement, les résidus basiques des domaines D1 et D2 sont engagés, comme précédemment montré pour le peptide C-terminal seul en interaction avec des oligosaccharides d'Hp [6]. On peut noter que le déplacement chimique des groupements amides des résidus K¹²⁸, R¹²⁹, K¹³⁰, R¹³¹ du domaine D1 et des résidus R¹³⁷ et R¹⁴⁰ du domaine D2 est fortement modifié par l'interaction avec des oligosaccharides d'Hp.

Ce résultat confirme ceux obtenus par Lortat-Jacob *et al.* [87] démontrant l'importance du domaine C-terminal de l'IFN γ dans l'interaction avec les HS. Cette première expérience justifie l'identification plus en détail de l'importance de chaque résidu basique du domaine D1 et D2 dans l'interaction avec les HS mais également avec le récepteur. C'est pourquoi ceci sera détaillé dans les paragraphes suivants.

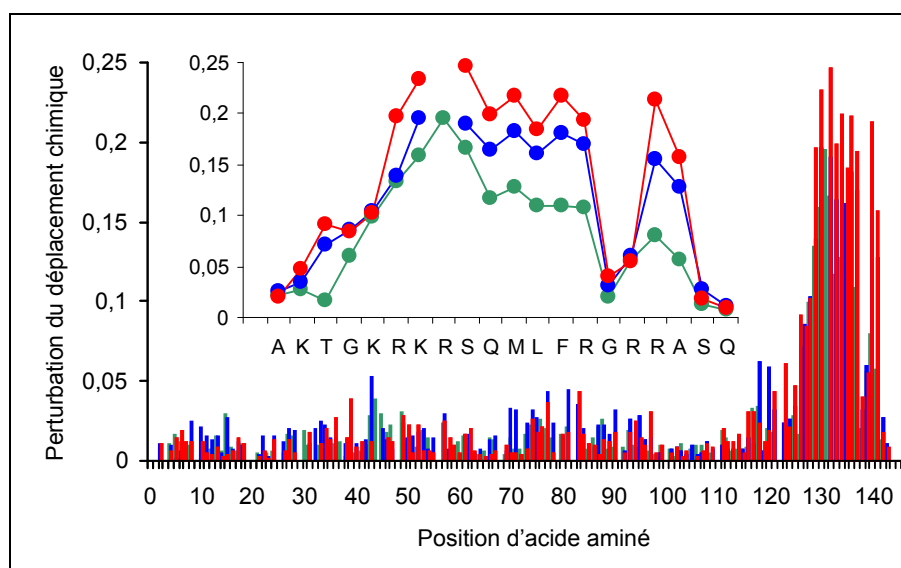


Figure 54 : Histogramme de la variation des déplacements chimiques de l'IFN γ lors de la titration avec différents oligosaccharides.

Le déplacement chimique des amides (¹⁵N et ¹H) des résidus de l'IFN γ lors de la titration avec différents oligosaccharides (dp2, dp4 et dp8) issus d'Hp est illustré sur l'histogramme en vert pour la titration de l'IFN γ avec le dp2, en bleu avec le dp4 et en rouge avec le dp8. Le déplacement chimique est calculé en prenant en compte le déplacement chimique du ¹⁵N et ¹H des groupements amides de l'IFN γ entre l'IFN γ sans ajout de ligand et avec ajout de la plus haute concentration de ligand (ratio oligosaccharide/IFN γ 8,7, 3,7 et 1,1 pour dp2, dp4 et dp8 respectivement). L'importance des deux domaines basiques D1 et D2 du domaine C-terminal de l'IFN γ est caractérisée par un grand changement du déplacement chimique. Le déplacement chimique d'autres résidus est peu affecté par l'interaction de l'IFN γ avec des oligosaccharides, ces résidus ne semblent donc pas intervenir dans l'interaction de l'IFN γ avec des oligosaccharides issus d'Hp. Dans la figure, l'insert montre la séquence 124-143 correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine.

I.3. Purification des mutants de l'IFN γ

I.3.a. Purification des mutants ponctuels

Le domaine d'interaction de l'IFN γ pour les HS est localisé dans l'extrémité C-terminale de la protéine qui contient deux domaines basiques, nommés dans la suite du manuscrit : domaine D1 - résidu 125 à 131 - et D2 – résidu 137 à 140 -. Afin de déterminer le rôle précis de chaque résidu présent dans ces domaines, des mutants ponctuels sont exprimés et purifiés. Chaque résidu basique présent dans ces domaines, comprenant des résidus d'arginines ou des résidus de lysine est muté en résidus de serine, la liste des différents mutants est représentée en figure 55.

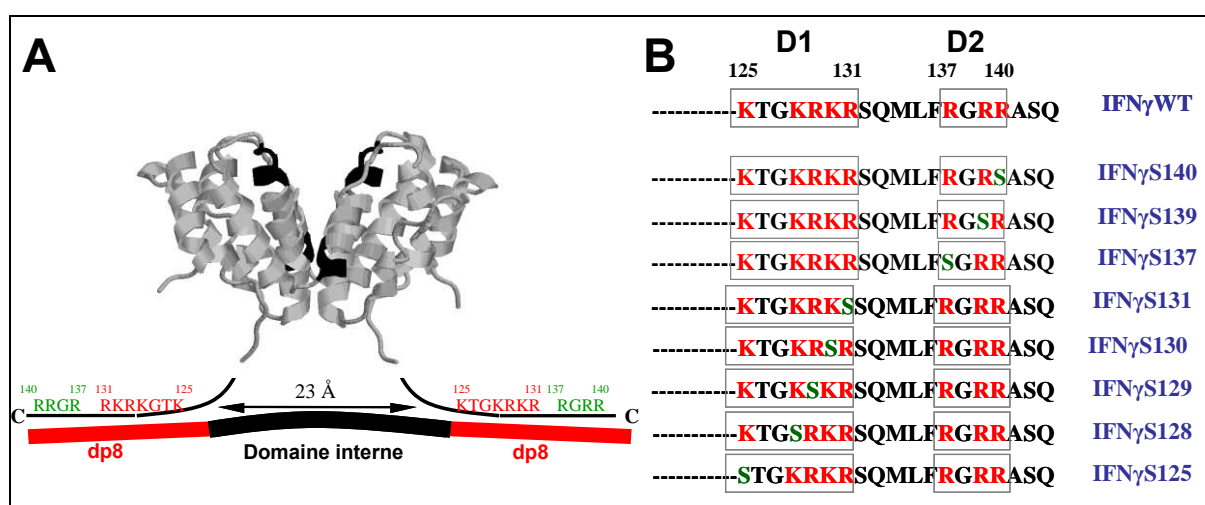


Figure 55 : Liste des mutants ponctuels produits.

A. Modèle de l'interaction entre l'IFN γ et des HS proposé par Lortat-Jacob *et al.* en 1995 [304]. B. Représentation du domaine C-terminal de l'IFN γ WT avec ses deux domaines basiques, D1 et D2. Puis représentation des mutants ponctuels où chaque résidu basique, les résidus d'arginine ou de lysine, dans D1 ou D2 est muté en résidu de serine.

Les vecteurs contenant le gène codant pour chaque mutant étaient disponibles dans le laboratoire et ont été produits grâce à l'utilisation du kit de mutagenèse dirigée « QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit » (Stratagène®). Ce kit permet de créer des mutations ponctuelles en modifiant un AA spécifique *via* l'utilisation d'amorces contenant le résidu modifié.

L'expression et la purification de ces mutants est totalement analogue à celui de l'IFN γ WT, malgré un rendement plus faible pour certains mutants. Tous les mutants sont obtenus purs - estimation par SDS-PAGE -, non dégradés - vérification par spectrométrie de masse -, et en grande quantité - leur concentration est déterminée par dosage d'AA -. La masse moléculaire

théorique et celle observée expérimentalement par spectrométrie de masse ainsi que le rendement de la purification pour chaque mutant est illustré sur le tableau 5 (page 144).

I.3.b. Mise au point de la purification des mutants IFN γ SD1, IFN γ SD2, IFN γ Δ136 et IFN γ Δ124

Dans un second temps et afin d'examiner le rôle des deux domaines basiques entiers (D1 et D2), des mutants multiples, respectivement IFN γ SD1 et IFN γ SD2, sont produits (figure 56). De même que pour les mutants ponctuels, les vecteurs d'expression étaient déjà disponibles dans le laboratoire. Ils sont obtenus par des mutagenèses ponctuelles successives de résidus basiques présents dans chacun des deux domaines basiques.

Dans l'introduction il a été spécifié que l'IFN γ peut être partiellement dégradé de son domaine C-terminal *in vivo* et que ceci a des effets sur son activité. Pour déterminer le rôle de D1 et de D2 dans un contexte physiologiquement plus pertinent, les deux mutants de troncation, IFN γ Δ124 – dépourvu des deux domaines basiques – et IFN γ Δ136 – dépourvu du domaine basique D2 – sont aussi exprimés et purifiés. Les vecteurs d'expression correspondant sont obtenus par l'ajout d'un codon stop aux parties correspondantes aux AA 125 et AA 137 (figure 56).

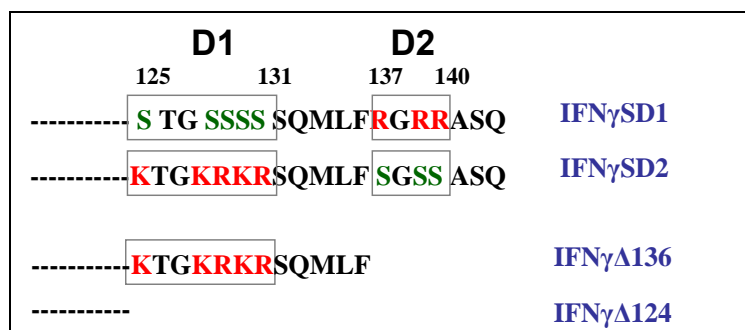


Figure 56 : Présentation des mutants multiples et des mutants issus de la délétion du domaine C-terminal de l'IFN γ .

Le mutant IFN γ SD1 est dépourvu de ses résidus basiques présents dans le domaine D1 et IFN γ SD2 de ceux présents dans le domaine D2, leurs résidus basiques sont mutés en résidus de sérine. Dans la nature, différentes formes de l'IFN γ peuvent être observées à l'issue d'une protéolyse partielle: l'IFN γ Δ124 dépourvue des deux domaines basiques et l'IFN γ Δ136 uniquement du domaine D2.

Nous avons d'abord essayé d'exprimer et de purifier l'IFN γ SD1 et l'IFN γ SD2. L'expression de ces mutants, suit le même protocole que celui utilisé pour l'expression de l'IFN γ WT et n'a posé aucun problème malgré un taux d'expression légèrement inférieur. Cependant, beaucoup de protéines sont perdues lors du repliement de l'IFN γ SD1 et de l'IFN γ SD2 par agrégation en utilisant ce protocole. La fraction contenant l'IFN γ SD1 et l'IFN γ SD2, après purification par la colonne MonoS, est particulièrement visqueuse. Pour s'assurer de la présence de la protéine

nous avons réalisé un spectre d'absorbance. Sur ce spectre, l'absorbance à 260 nm est supérieure à celle mesurée à 280 nm indiquant la présence d'une contamination par l'ADN, ce qui signifie que le protocole de purification devait être modifié. Ceci fût un travail extrêmement laborieux comportant de nombreux essais pendant lesquels nous avons, lors de chaque modification, essayé de purifier à la fois l'IFN γ SD1 et l'IFN γ SD2.

- **Essai d'optimisation de la dégradation de l'ADN**

Dans un premier temps, afin d'éliminer l'ADN présent dans la fraction contenant de l'IFN γ SD1/SD2, le temps de digestion de l'ADN par la DNaseI, sur les CI après la lyse des bactéries, est passé de 30 min à 2 h puis 4 h. La DNaseI est une endonucléase coupant l'ADN double et simple brin. Aucune différence de présence d'ADN après une digestion plus importante n'a été remarquée lors de l'élution par chromatographie échangeuse de cations. Ensuite une autre endonucléase a été utilisée, la benzonase. Celle-ci coupe également l'ADN double et simple brin, mais est décrite comme étant plus active que la DNaseI. Elle a été incubée, comme la DNaseI, après la lyse des bactéries pendant 30 min, 2 h ou 4 h, sans pour autant améliorer l'élimination de l'ADN. L'augmentation de sa concentration 10 fois par rapport à la concentration d'utilisation décrite a également été sans effet significatif.

Puisque nous ne sommes pas parvenus à éliminer l'ADN après le cassage des cellules, nous avons tenté de l'enlever après la première colonne de purification : la colonne échangeuse de cations. De plus, un avantage potentielle de la digestion d'ADN après cette étape est que l'IFN γ SD1/SD2 est déjà partiellement purifié et présent dans un volume plus réduit. Cependant, cette digestion supplémentaire d'une durée de 2 h, 4 h ou de 16 h n'a eu aucun effet significatif. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'ADN et les protéines sont compactés dans les CI et donc peu accessibles aux endonucléases.

D'autre part, nous avons tenté de lyser plus amplement les bactéries dans le but de fragmenter l'ADN lors de cette étape. Des lyses supplémentaires par de multiples passages à la presse de french ou par étape supplémentaire de sonication - connue pour fragmenter l'ADN en même temps que la lyse - n'ont pas abouti à l'élimination de l'ADN. Etant donné que cette technique n'a pas éliminé l'ADN de la préparation d'IFN γ SD1/SD2, nous avons effectué une lyse utilisant une aiguille (« 19 gauge »). Cette méthode de lyse permet de garder le matériel génétique intact. Nous avons pensé qu'en gardant l'ADN intact, il ne serait plus capable d'interagir avec l'IFN γ SD1/SD2 et ne contaminera ainsi pas la préparation de ce dernier. Cependant même après la purification par MonoS, la fraction contenant l'IFN γ SD1/SD2 était encore toujours contaminée par l'ADN.

La présence d'ADN est compréhensible, car l'ADN peut jouer un rôle de chaperone pour le repliement de la cytokine [377]. De plus, l'ADN peut également interagir avec des zones basiques de la protéine telle que le domaine C-terminal de l'IFN γ . Cette interaction peut stabiliser l'IFN γ et ainsi aider à le replier. Par la suite, nous avons essayé de séparer la fraction de l'ADN de celle de la protéine plutôt que de fragmenter l'ADN.

- **Essais de séparation de la protéine et de l'ADN**

- Un lavage des CI plus poussé

Les lavages des CI sont accompagnés par deux lavages supplémentaires avec 4 M d'urée. L'urée étant un chaotrope non chargé, il dénature les protéines et l'ADN. Nous avons ainsi essayé de solubiliser plus amplement l'ADN afin de le séparer de l'IFN γ SD1/SD2. Cependant la fraction contenant l'IFN γ SD1/SD2, éluant de la colonne MonoS, contenait encore et toujours de l'ADN, des lavages supplémentaires des CI ne permettent donc pas de séparer la protéine de l'ADN.

- Séparation par colonne échangeuse d'ions

Afin de séparer la protéine de l'ADN, nous avons essayé de tirer avantage du fait que l'ADN reste accroché à une colonne DEAE (GE Healthcare®) contrairement à l'IFN γ SD1/SD2 ayant un pI basique. La colonne DEAE est une colonne échangeuse d'ions faibles sur un support de cellulose. L'idée étant qu'en passant la fraction de l'IFN γ repliée contaminée par l'ADN sur la colonne, l'ADN y reste accroché mais pas l'IFN γ . L'ADN pourrait après élution de l'IFN γ être élué par l'ajout d'un tampon contenant du sel. Les deux composants, protéine et ADN, n'ont pas pu être séparés car la protéine reste accrochée à la colonne et est éluee en même temps que l'ADN du fait de l'ajout du sel. Afin de vérifier que l'IFN γ ne reste pas accroché sur la colonne par des interactions non-spécifiques avec la matrice, une autre colonne avec une autre matrice a été testée : la colonne Mono Q (GE Healthcare®). Ceci est une colonne échangeuse d'ions forts avec une matrice polystyrene/divinylbenzene. Aucune séparation protéine/ADN n'a été observée. L'IFN γ SD1/SD2 ne semble donc pas interagir avec la matrice mais est fortement complexé avec l'ADN.

- Séparation par colonne hydrophobe

L'élution de l'IFN γ SD1/SD2 sur une colonne retenant l'ADN s'est avérée sans succès. C'est pourquoi nous avons tenté d'effectuer l'expérience inverse à savoir retenir l'IFN γ SD1/SD2 sur une colonne tout en éluant l'ADN. Pour cela deux colonnes hydrophobes ont été testées : la HiTrap Phenyl-Sepharose et la HiTrap octyl-Sepharose (GE Healthcare®). La première, contient des groupements phenyls qui interagissent avec les AA aromatiques par « π -

stacking ». La seconde, contient des groupements qui s'attachent par interactions hydrophobes avec les AA hydrophobes. Ces colonnes devraient retenir spécifiquement l'IFN γ SD1/SD2 et non l'ADN. L'IFN γ SD1/SD2 replié est directement placé sur la colonne hydrophobe. L'idée étant d'éluer l'ADN complexé à l'IFN γ par un tampon contenant du sel 3 M avant d'éluer l'IFN γ SD1/SD2 par gradient inverse. Cependant, l'IFN γ n'est pas resté accroché à la colonne. Une des hypothèses est que les zones hydrophobes ou aromatiques de l'IFN γ ne sont pas accessibles et ne peuvent pas interagir avec la matrice de la colonne. L'IFN γ a alors été élué avec le « flow through » et à nouveau nous n'avons pas pu séparer l'IFN γ de l'ADN.

Il est donc clair que l'ADN est fortement complexé à l'IFN γ SD1/SD2 et que nous ne sommes pas parvenus à le dégrader ou à le décomplexer de l'IFN γ SD1/SD2. De plus, dans les rares cas où il semblait que nous avions réussi la dégradation de l'ADN complexé à l'IFN γ SD1/SD2 ceci a provoqué la précipitation de la totalité de l'IFN γ SD1/SD2. La présence de l'ADN semble donc nécessaire pour replier ou solubiliser les formes mal repliées de l'IFN γ SD1/SD2.

De ce fait, nous avons essayé deux stratégies totalement différentes : la production de la cytokine déjà repliée et l'amélioration du repliement de l'IFN γ exprimé en CI. Pour la première stratégie, l'IFN γ a été purifié avec une étiquette MBP (maltose binding protein). Cette étiquette aide le repliement de la protéine à laquelle il est lié et augmente la solubilité de la protéine de fusion. De cette façon, nous espérons produire de l'IFN γ replié et soluble, évitant ainsi l'étape critique du repliement. Dans la seconde stratégie, nous avons essayé d'optimiser les conditions de repliement de la protéine. Dans ce cas, l'hypothèse de travail est que si l'IFN γ SD1/SD2 est correctement replié, il n'est pas complexé à l'ADN. Plusieurs additifs, connus comme chaperones artificielles, ont alors été testés pour stabiliser le repliement de l'IFN γ .

- **Expression et purification d'une protéine de fusion IFN γ -Ni-MBP**

A défaut de pouvoir purifier l'IFN γ SD1/SD2 par le protocole utilisé pour l'IFN γ WT, nous avons choisi de le produire grâce à une protéine de fusion contenant une étiquette MBP - afin d'augmenter la solubilité et le rendement de la production de la protéine recombinante - ainsi qu'une étiquette histidine - très utilisée pour la purification par colonne d'affinité - [378-379]. L'IFN γ SD1/SD2 est ainsi probablement exprimé de façon soluble.

Le fragment correspondant au gène codant pour l'IFN γ SD1 est récupéré du vecteur pET11a/IFN γ SD1 par coupure avec les enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI*. Cet insert est

par la suite ajouté dans le vecteur pDB.His.MBP (figure 57). Ce vecteur contient un gène codant pour la résistance à la kanamycine, un site de liaison pour la T7-ADN-polymérase suivi d'une étiquette histidine et d'une étiquette MBP, un site de clivage à la protéase du TEV (Tobacco Etch Virus) et enfin un MCS (Multiple Cloning Site) contenant des séquences clivées par les enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI*.

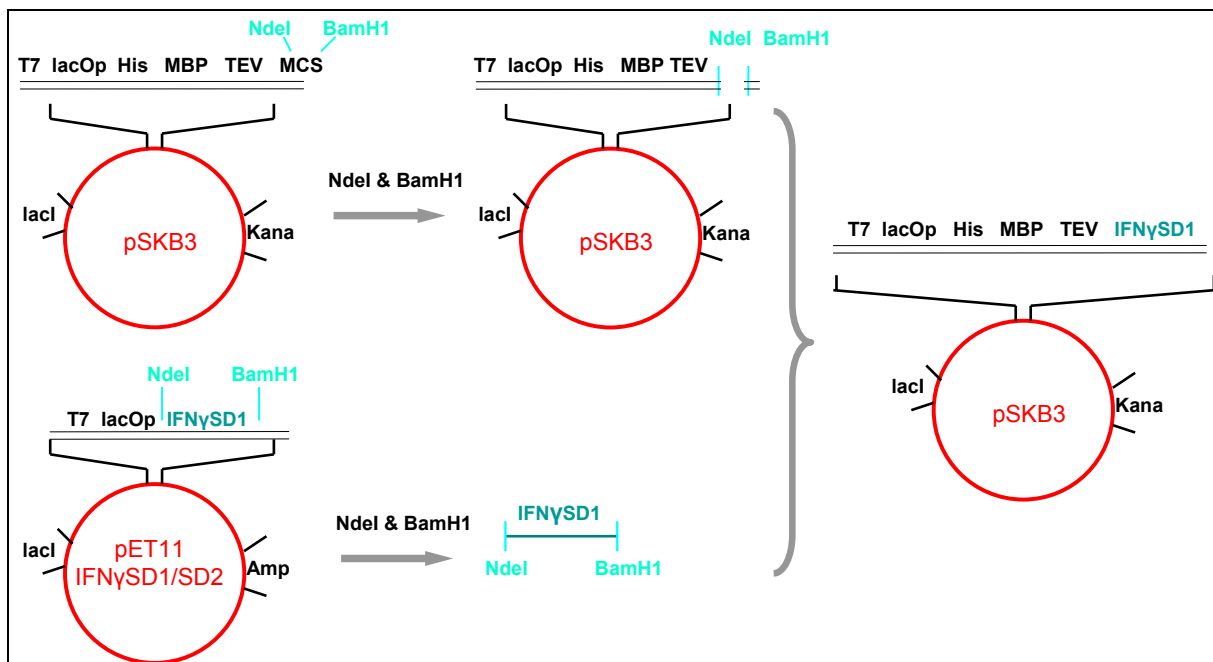


Figure 57 : Clonage de l'IFN γ SD1 dans le vecteur pDB.His.MBP.

Le vecteur pDB.His.MBP est obtenu à partir du vecteur pSKB3. Il contient le promoteur pour le T7-ADN-polymérase suivi d'une étiquette *His* et *MBP*, d'un site de coupure à la protéase du TEV et d'un MCS. Ce vecteur est linéarisé par la coupure des enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI*. Le vecteur pET11a/IFN γ SD1 est coupé par ces mêmes enzymes de restriction afin de récupérer l'insert correspondant au gène codant pour l'IFN γ SD1. Après purification sur gel du vecteur pDB.His.MBP et de l'insert de l'IFN γ SD1 les deux sont liés par le kit de ligation de l'ADN. La présence de l'IFN γ SD1 dans ce nouveau vecteur est vérifiée par PCR.

La présence du gène codant pour l'IFN γ SD1 dans le vecteur pDB.His.MBP est vérifiée par PCR suivi d'une analyse sur gel d'agarose, illustrée sur la figure 58.B. Tous les clones obtenus contiennent ce gène et l'ADN correspondant à un clone est vérifié par séquençage.

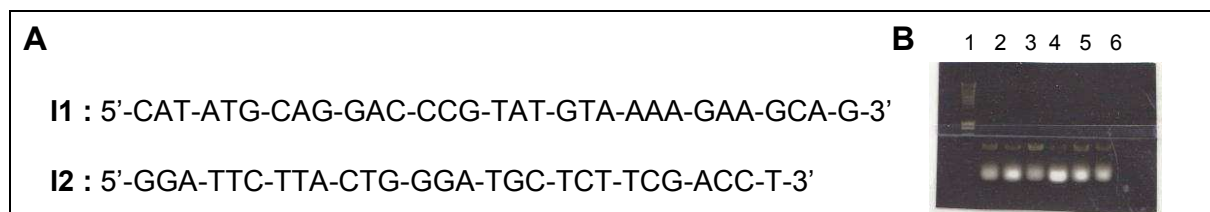


Figure 58 : Vérification de la présence de l'insert IFN γ SD1 dans le vecteur pDP.His.MBP.
A. Séquence des amorces utilisées pour amplifier l'ADN du gène codant pour l'IFN γ SD1. Les amorces utilisées correspondent à la séquence du début et de la fin du gène codant pour l'IFN γ SD1. **B.** Vérification de la présence du gène codant pour l'IFN γ SD1 dans le vecteur pBD.His.MBP. Gel d'agarose de la réaction PCR effectuée avec le vecteur pDB.His.MBP/IFN γ SD1 obtenu par ligation afin de valider la présence du gène codant pour l'IFN γ SD1. Gel d'agarose avec (1) marqueur de poids moléculaire, (2-6) analyse de 5 clones obtenus. Tous les clones obtenus contiennent le gène.

Ce vecteur pDB-His-MBP/IFN γ SD1 est utilisé pour la transformation des bactéries *E.coli* BL21 (*Star*) DE3. Différentes conditions d'expression de la protéine sont testées afin d'obtenir l'expression de cette protéine de fusion recombinante soluble et en grande quantité, illustrées sur la figure 59. Premièrement, l'ajout de l'IPTG déclenche effectivement l'expression de la protéine de fusion, car sans l'ajout de ce dernier nous n'observons qu'une faible quantité de protéines avec une masse moléculaire d'environ 60 kDa, correspondant à la protéine de fusion avec la MBP (\pm 42.5 kDa), l'étiquette His, le site de coupure à la protéase du TEV et l'IFN γ SD1 (\pm 17 kDa). Deuxièmement, l'influence de la concentration de l'IPTG est testée et aucune différence entre l'induction avec de l'IPTG 0,5 ou 1 mM n'a été remarquée. Troisièmement, l'influence du temps et de la température d'induction a été vérifiée. L'IFN γ SD1-MBP a été produit en grande quantité et est majoritairement soluble par l'induction avec 0,5 mM IPTG pendant 22h à 22°C. Ces conditions sont utilisées pour exprimer la protéine de fusion.

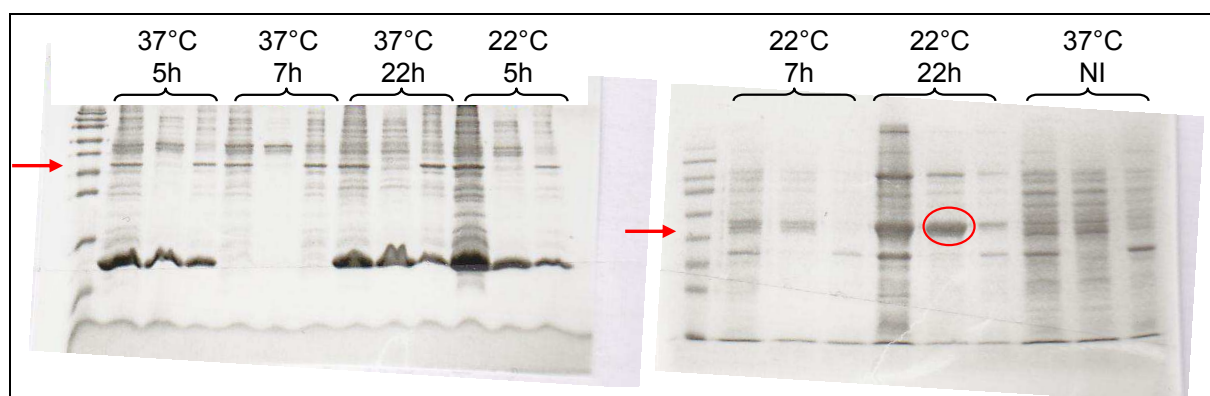


Figure 59 : Test d'expression de la protéine de fusion.
 20 mL de culture *E.coli* BL21 (*Star*) DE3 transformée avec le vecteur pBD.His.MBP/IFN γ SD1 est induite avec de l'IPTG 0,5 mM puis mis sous agitation pendant 5 h, 7 h ou 22 h à 37°C ou 22°C. Les cellules sont ensuite lysées par cycles de congélation et décongélation. Le lysat bactérien total (à gauche), la partie soluble (au milieu) et le culot du lysat bactérien (à droite) sont déposés sur un SDS-PAGE pour chacune de ces conditions. L'efficacité de l'induction est vérifiée par la non induction d'une culture avant d'être mis sous agitation pendant 7 h à 37°C.

La protéine de fusion est exprimée en plus grand volume avec ces mêmes conditions afin de la purifier. Pour cela, le surnageant de la culture bactérienne est purifié par colonne de nickel. Le lysozyme, utilisé pour fragiliser la paroi bactérienne, est élué en grande quantité pendant la charge et les étapes de lavages de la colonne. L'IFN γ SD1-MBP est élué par l'ajout de l'imidazole 300 mM et est à cette étape déjà relativement pur (figure 60.A).

Enfin, les étiquettes His et MBP de la protéine de fusion sont supprimés par la protéase du TEV. Effectivement, un site de coupure pour cette protéase est présent entre les étiquettes et l'IFN γ SD1. La protéine de fusion est partiellement coupée par la protéase du TEV après 1 h d'incubation. Nous observons dès lors un fragment correspondant aux étiquettes His-MBP avec une masse moléculaire d'environ 43 kDa. En revanche le fragment purifié qui devrait correspondre à l'IFN γ SD1 (avec une masse moléculaire d'environ 17 kDa) a une masse moléculaire d'environ 26 kDa. L'IFN γ n'est alors pas obtenu sous sa forme attendue (figure 60.B) et cette approche n'est pas poursuivie.

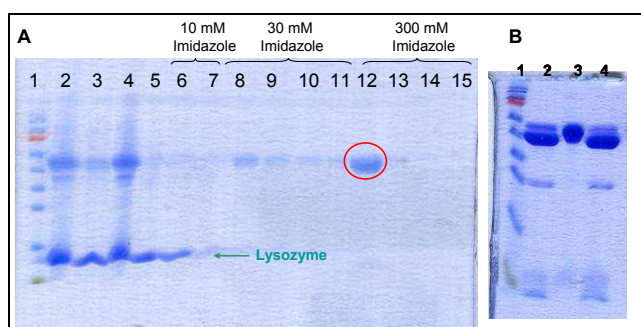


Figure 60 : Purification de l'IFN γ SD1-MBP et coupure d'une étiquette MBP.

A. Purification de l'IFN γ -MBP sur colonne de nickel. La construction de l'IFN γ SD1-MBP contient également une étiquette histidine. Cette étiquette est utilisée pour la purification de la partie soluble du lysat bactérien sur colonne de Ni. (1) Marqueur (2) Lysat bactérien (3) Culot du lysat bactérien (4) Surnageant du lysat bactérien (5) Partie non accrochée à la colonne (6-7) Lavage de la colonne avec de l'imidazole 10 mM (8-11) Lavage de la colonne avec de l'Imidazole 30 mM (12-15) Elution des protéines retenues avec de l'imidazole 300 mM. Dans les fractions non retenues nous retrouvons une quantité considérable de lysozyme utilisé pour fragiliser la paroi bactérienne. L'IFN γ SD1-MBP est élué avec de l'imidazole 300 mM. **B Coupure par la protéase du TEV de l'IFN γ SD1-MBP purifié.** La protéine de fusion IFN γ SD1-MBP contient un site de coupure pour la protéase du TEV entre l'étiquette MBP-His et l'IFN γ . Nous avons essayé d'enlever ces étiquettes par la digestion avec la protéase du TEV. 1. Marqueur 2. Digestion à la protéase du TEV pendant 30 min 3. Fraction contenant l'IFN γ SD1-MBP 4. Digestion à la protéase du TEV pendant 60 min. La fraction purifiée est encore légèrement contaminée par le lysozyme. La digestion ne libère pas l'IFN γ SD1 car la fraction coupée migre avec une MM de 26 kDa. Cependant, l'étiquette MBP-His migre avec une masse moléculaire attendue d'environ 43 kDa.

- **L'ajout des additifs pendant le repliement**

Le repliement des protéines, exprimées dans des CI, est une étape très sensible car il arrive fréquemment que ces protéines s'agrègent. Des « chaperones artificielles », comme des osmolytes, peuvent être ajoutés afin de diminuer l'agrégation protéique. Ces dernières sont connues pour la stabilisation des protéines et sont utilisées en tant que « chaperones artificielles » qui changent la viscosité et la tension de surface des tampons. Certaines d'entre elles interagissent également directement avec la protéine.

Afin de replier l'IFN γ SD1/SD2 correctement et sans contamination de l'ADN, nous avons testé trois adjuvants de repliement (figure 61). (1) Du L-arginine : qui est un acide aminé - les AA sont connus pour la stabilisation du repliement - et également un chaotrope - molécule stabilisant les zones hydrophobes empêchant ainsi l'agrégation via ces zones -. (2) De l'Hp : un polyanion analogue à l'ADN qui semble nécessaire pour le bon repliement de l'IFN γ SD1/SD2. (3) Du glycérol : un polyol connu pour augmenter considérablement la viscosité de la solution, les protéines diffusent ainsi moins facilement et les risques d'agrégation sont ainsi diminués [380-381].

Le taux de l'IFN γ SD1/SD2 correctement replié a été estimé par SDS-PAGE en comparant la quantité de l'IFN γ SD1/SD2 replié et agrégé (figure 61). Sans ajout d'adjuvant, nous observons que la moitié de l'IFN γ SD1/SD2 est repliée et que l'autre moitié est agrégée. Cependant, des expériences précédentes ont démontré que la fraction de l'IFN γ SD1/SD2 replié est malgré tout contaminée par l'ADN. L'ajout de l'Hp 50 μ g/mL ou du glycerol 10 % provoque l'agrégation de presque la totalité de l'IFN γ SD1/SD2. En revanche, l'ajout du L-arginine 0,5 M améliore fortement le taux de repliement de l'IFN γ SD1/SD2, puisque la majorité de l'IFN γ SD1/SD2 est replié et très peu d'IFN γ SD1/SD2 a été précipité dans le culot. De plus, le rapport des absorbances entre 260 nm et 280 nm indique que l'IFN γ SD1/SD2, replié dans ces conditions, ne contient pas d'ADN ou très peu. En revanche, la purification de l'IFN γ SD1/SD2 sur colonne Mono S pose ensuite un problème du fait de la présence du L-arginine, également chargée positivement et présente en grande quantité. Effectivement, l'IFN γ SD1/SD2 ne s'attache plus à la colonne. L'élimination du L-arginine après le repliement est alors entreprise suivant deux méthodes : premièrement une dialyse classique avec des membranes de dialyse (spectropor7 MWCO 10 kDa) ou deuxièmement par cycles de concentration et dilution (Centricon MWCO 30 kDa). Cependant dès lors que la concentration de L-arginine diminue, l'IFN γ SD1/SD2 précipite.

Pour résumer, malgré le fait d'avoir exprimé et obtenu le repliement de l'IFN γ SD1/SD2 en l'absence d'ADN, le fait de retirer la L-arginine (nécessaire pour la purification sur colonne Mono S), induit une agrégation d'IFN γ .

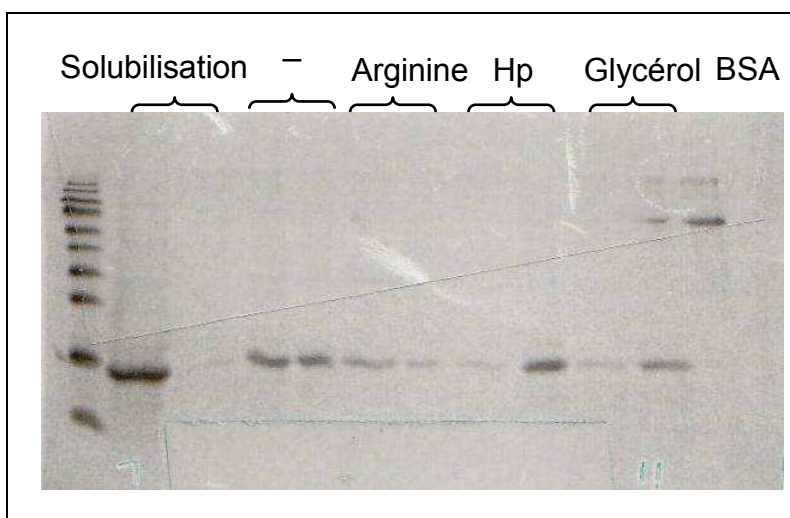


Figure 61 : Influence des adjuvants sur le repliement de l'IFN γ SD1.

Les CI lavés, correspondant à l'induction d'un litre de culture LB avec l'IFN γ SD1, sont solubilisés avec du chlorure de guanidinium 6 M à 2,4 mg/mL et séparés en quatre fractions. Chaque fraction solubilisée est repliée par dilution jusqu'à 0,2 mg/mL de protéine dans un tampon contenant du Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,5 seul ou additionné du L-arginine 0,5 M, de l'Hp 50 µg/mL ou du glycérol 10 %. L'efficacité du repliement est constatée par SDS-PAGE : pour chaque condition le surnageant est déposé à gauche et le culot à droite. C'est dans la condition contenant du L-arginine 0,5 M que l'IFN γ SD1 se replie le mieux.

- **Le graal : un protocole de purification qui fonctionne !**

En comparant tous les éléments aidant à l'expression et la purification de l'IFN γ SD1/SD2 en l'absence d'ADN avec le protocole de purification décrit par Arora et Khanna en 1996 [328] nous nous sommes aperçus de plusieurs similitudes. En effet, Arora et Khanna utilisent également la L-arginine pour améliorer le repliement de l'IFN γ sauvage. De cette façon il est correctement replié et est par la suite dialysé en présence de 100 mM d'urée. L'urée stabilise, comme la L-arginine, l'IFN γ replié mais ne gêne pas la purification par chromatographie échangeuse de cations. Sa présence est désormais essentielle pour empêcher l'agrégation de la cytokine lors de la dialyse permettant d'enlever la L-arginine.

Les conditions de repliement sont également différentes de celles que nous avons utilisées pour l'IFN γ WT et les mutants ponctuels : un tampon Tris-HCl, pH 8,0 au lieu d'un tampon contenant du Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,5 et une concentration initiale d'IFN γ plus élevée lors de la solubilisation (10 mg/mL au lieu de 2,4 mg/mL) mais en revanche une plus grande dilution pendant le repliement (28 fois au lieu de 12 fois). En suivant ce protocole de purification scrupuleusement, avec pour seule différence une acidification du tampon avant la mise sur la colonne MonoS, aucune difficulté de repliement de l'IFN γ SD1/SD2 n'a été

rencontrée et une fois replié ce dernier ne s'agrège plus lors de la dialyse (figure 62). De plus, la fraction de l'IFN γ SD1/SD2 éluée sur colonne Mono S ne contient plus d'ADN. Pendant la dernière colonne de purification, la filtration sur gel, la présence de 100 mM urée est éliminée mais l'IFN γ SD1/SD2 partiellement purifié reste soluble et ne s'agrège pas.

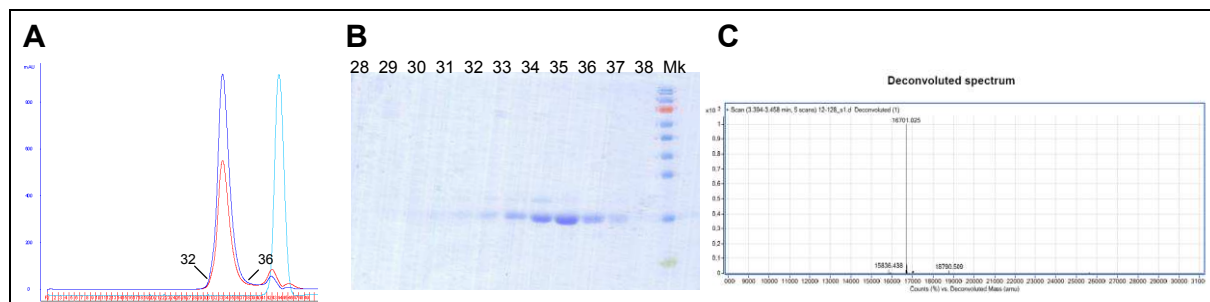


Figure 62 : Purification et validation de la pureté de l'IFN γ SD2.

A. Profil de la filtration sur gel de l'IFN γ SD2. L'IFN γ SD2 est élué avec un tampon contenant du tris-HCl 20 mM, du mannitol 25 mg/mL, pH 7,2, sur une Superdex 75. En bleu est indiquée l'absorbance à 280 nm, en rouge à 260 nm, la conductivité est indiquée en turquoise. B. SDS-Page du profil d'élution par filtration sur gel. 20 μ L des fractions 28-38 sont déposées sur le gel. Fractions 32-36 sont récupérées. C. Spectre déconvolué de la spectrométrie de masse par électrobulisaison des fractions récupérées de la filtration sur gel. L'IFN γ SD2 a une MM de 16 701,25 Da contre une MM théorique de 16 700 Da. L'échantillon n'est donc pas dégradé.

Nous avons donc réussi à mettre au point un protocole de purification de l'IFN γ SD1/SD2 sans contamination par l'ADN. En revanche, le rendement obtenu est moindre : environ 3 mg d'IFN γ SD1/SD2 par litre de culture contre 20 mg/L de culture pour l'IFN γ WT. Puisque nous avons eu les mêmes problèmes de contamination par l'ADN pour l'IFN $\gamma\Delta$ 124 et l'IFN $\gamma\Delta$ 136, nous avons employé ce même protocole dans les deux cas et à chaque fois avec succès !

I.3.c. *Résumé des purifications*

Chaque mutant est obtenu de façon pure (déterminé par SDS-PAGE) et non dégradé (vérifié par spectrométrie de masse). La concentration est obtenue par quantification des AA. Dans le tableau ci-dessous (tableau 5) sont indiqués les masses moléculaires théoriques et celles obtenues par spectrométrie de masse (MS) ainsi que le rendement par litre de culture bactérienne.

IFN γ	MM théorique	MM mesuré MS	Rendement (mg/L culture)
WT	16907,3	16907,7	19,19
mutants ponctuels D1			
S125	16866,2	16866,7	17,99
S128	16866,2	16866,6	2,15
S129	16838,2	16838,7	3,65
S130	16866,2	16866,6	5,57
S131	16838,2	16838,4	14,32
mutants ponctuels D2			
S137	16838,2	16838,6	2,69
S139	16838,2	16838,7	11,11
S140	16838,2	16838,6	13,35
mutants en série			
SD1	16645,8	16645,4	2,97
SD2	16700	16700,8	3,7
mutants de délétion			
Δ 124	14633,6	14634,2	0,59
Δ 136	16095,4	16096,1	5,22

Tableau 5 : Résumé de la purification de l'IFN γ WT et les différents mutants.

I.4. Test d'interaction de l'IFN γ avec son récepteur et avec les HS par SPR

I.4.a. Analyse de l'interaction de l'IFN γ avec les HS

Les expériences de perturbation des déplacements chimiques par RMN démontrent l'importance des résidus basiques des domaines D1 et D2 dans l'interaction avec l'Hp. Afin de déterminer plus précisément leur implication individuelle dans cette interaction, elle est également analysée par SPR. De cette façon, la différence d'affinité liée à la perte d'un résidu basique particulier ou d'un des deux domaines entier est calculée. De plus, une analyse cinétique de l'association et de la dissociation du complexe est potentiellement également possible.

- **Immobilisation de l'Hp sur la sensor chip**

Afin de mesurer l'interaction de l'IFN γ avec l'Hp par SPR, cette dernière doit être immobilisée sur la sensor chip (figure 63). Ceci est réalisé par le biais de l'interaction entre la streptavidine et la biotine. Pour cela, la streptavidine est immobilisée sur la sensor chip par la condensation des groupements carboxyles activés de la sensor chip et les groupements amines primaires de la streptavidine. Puis l'Hp biotinylée y est ajoutée, ce qui va conduire à

l'interaction entre la streptavidine et la biotine portée par l'Hp. L'immobilisation de l'Hp biotinylée ne devrait pas modifier l'interaction avec l'IFN γ car *in vivo* les HS sont également immobilisés sur la surface cellulaire.

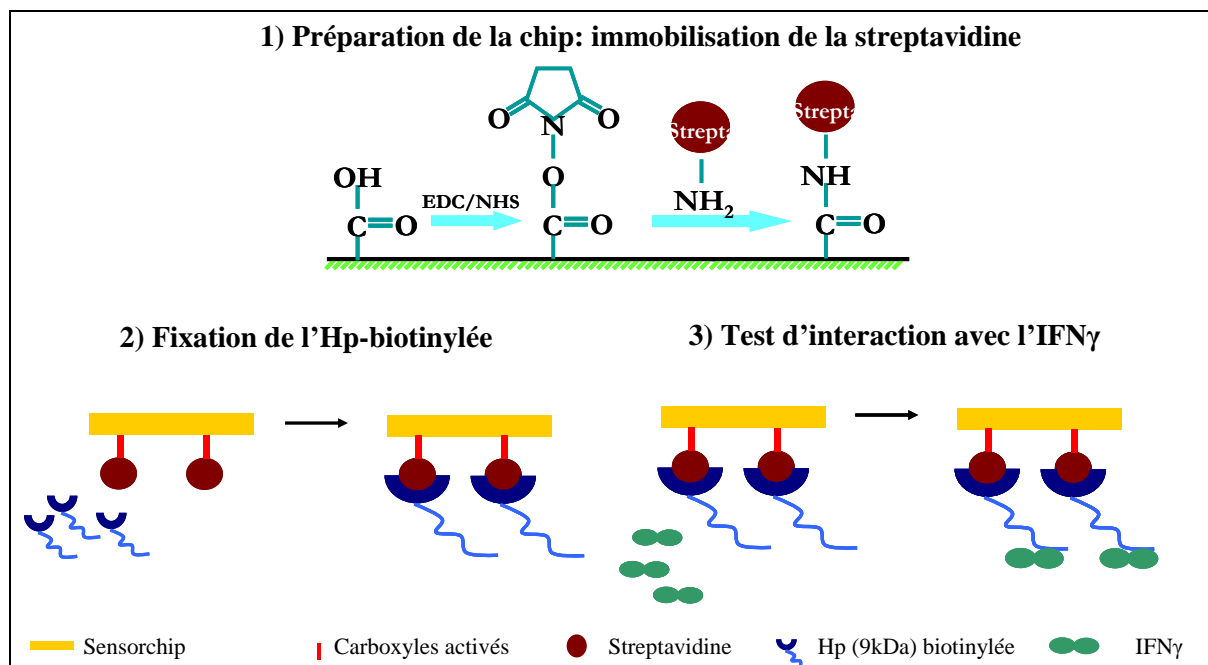


Figure 63 : Schéma de la méthode de l'immobilisation de l'Hp sur la sensor chip puis interaction avec l'IFN γ .

- Interaction de l'IFN γ WT et des mutants ponctuels avec l'Hp

Afin d'évaluer les constantes d'affinité de l'IFN γ WT et de tous les mutants ponctuels pour l'Hp, une même gamme de concentrations, entre 0 nM et 15 nM est injectée sur une surface fonctionnalisée avec de l'Hp (figure 64).

Une première manière d'analyser l'affinité entre l'IFN γ WT et l'Hp est la détermination de la constante d'affinité à l'aide du logiciel BIAevaluation. Cette méthode est dans notre cas controversée car la constante d'affinité (K_D cin) est calculée *via* la cinétique de l'interaction, par le rapport entre la constante de dissociation (k_d) et la constante d'association (k_a). Le problème étant que l'association est, dans notre cas, fortement limité par le transport de masse. De ce fait, la constante d'association calculée par le logiciel ne prend pas uniquement en compte la constante d'association « réelle » mais également le transport de masse. En effet, nous observons une constante d'association extrêmement élevée ($k_a = 8,90.10^9 \pm 4,86.10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et très peu précise. La valeur de la constante d'affinité (K_D cin, tableau 6) ainsi déterminée est donc biaisée par ce transport de masse, ceci est également visible par un mauvais ajustement des courbes (figure 64) et des grandes erreurs standard (tableau 6).

C'est pour cette raison que les courbes d'interaction sont analysées par la linéarisation de Scatchard employant la quantité de ligands liés à l'équilibre et la concentration totale de ligand (dans notre cas celle de l'IFN γ). Ainsi, cette méthode n'est pas influencée par le transport de masse. Cette méthode de détermination de la constante d'affinité sera plus amplement détaillée dans le paragraphe II.3.c. Une forte affinité entre l'IFN γ WT et l'Hp immobilisé sur la chip est observée, elle est caractérisée par une constante d'affinité de $1,4 \pm 0,2$ nM. Cette affinité est comparable à celle mesurée auparavant ($K_D = 1,5$ nM) [314].

Ensuite, nous avons déterminé l'affinité des mutants du domaine C-terminal de l'IFN γ pour l'Hp. Ces résultats démontrent que les résidus basiques du domaine D1 sont impliqués dans l'interaction de l'IFN γ avec les Hp comme indiqué par la diminution de leur constante d'affinité (figure 65 et 66) - K_D (S125) $4,8 \pm 0,9$ nM, K_D (S128) $= 9,4 \pm 1,6$ nM, K_D (S129) $= 8,8 \pm 0,7$ nM, K_D (S130) $= 7,5 \pm 1,3$ nM et K_D (S131) $= 8,8 \pm 1,8$ nM - par rapport à celle de l'IFN γ WT - $K_D = 1,4 \pm 0,2$ nM -. De plus, on remarque que le résidu K¹²⁵ est moins impliqué que les autres résidus basiques présents dans ce domaine, ceci est cohérent avec les résultats obtenus par RMN (paragraphe I.2). Les résidus basiques du domaine D2 sont également impliqués dans l'interaction de l'IFN γ avec les Hp (figure 65 et 66) - K_D (S137) $= 4,2 \pm 1,1$ nM, K_D (S139) $= 4,2 \pm 1,2$ nM, K_D (S140) $= 3,9 \pm 0,3$ nM - mais moins que ceux du domaine D1. En revanche, l'expérience par RMN, n'a pas mis en avant l'implication du résidu R¹³⁹ dans l'interaction IFN γ :Hp, qui semble, d'après ces tests d'interaction par SPR, aussi importante que les autres résidus basiques de ce domaine.

Somme tout, ces expériences quantifient la contribution de chaque résidu basique, présent dans l'extrémité C-terminale de l'IFN γ , pour l'interaction IFN γ :Hp. Des similitudes sont observées pour les résidus provenant d'un même domaine basique et les résidus basiques du domaine D1 semblent plus importants que ceux du domaine D2 pour l'interaction de l'IFN γ avec l'Hp.

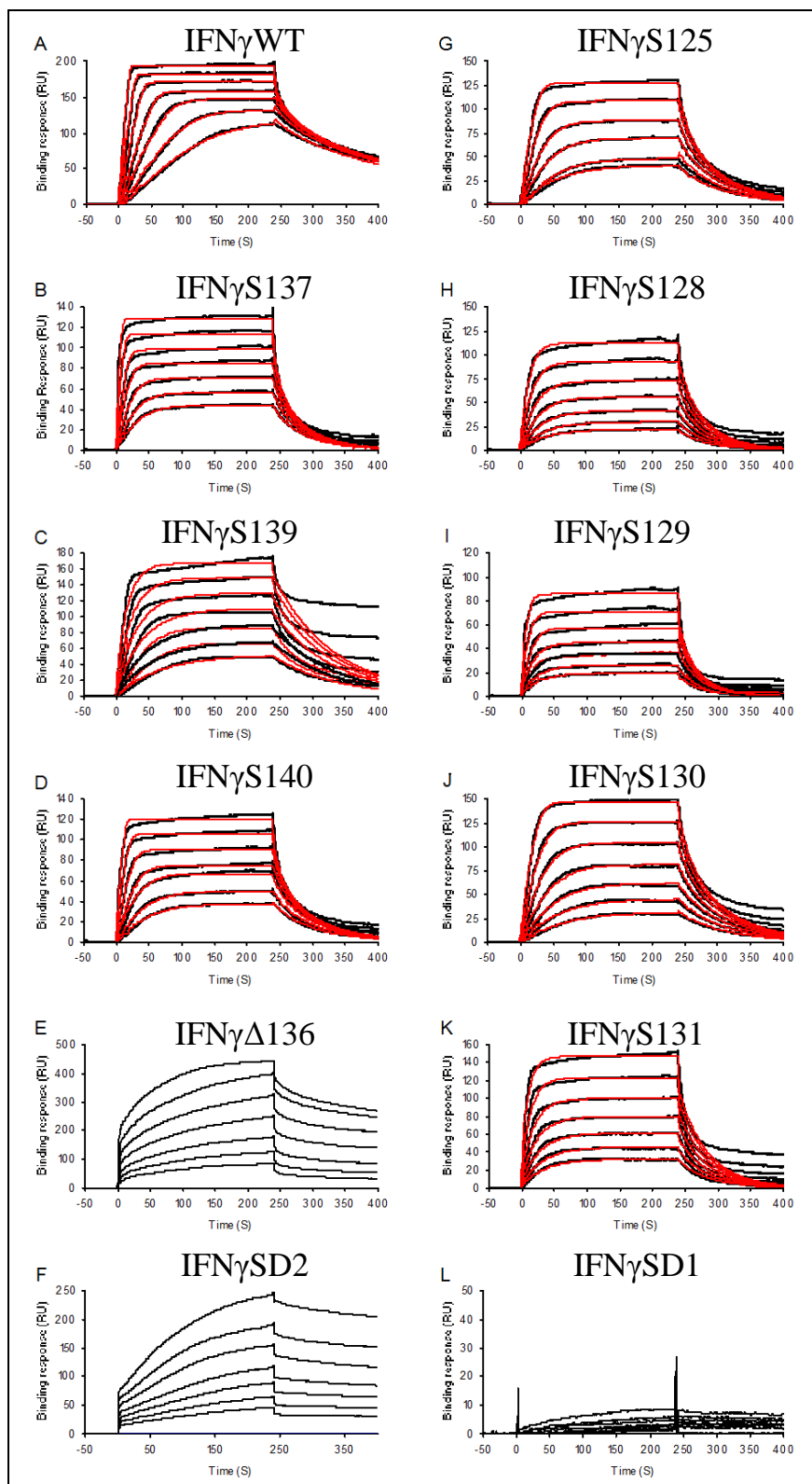


Figure 64 : Sensorgrammes de l'IFN γ avec de l'Hp immobilisée.

L'IFN γ WT et mutants (0 -15 nM sauf pour l'IFN γ Δ136 0-150 nM et l'IFN γ SD1 0-1500 nM) sont injectés sur une sensor chip, contenant de l'Hp immobilisée, à un débit de 60 μ L/min pendant 5 min, l'IFN γ est ensuite remplacé par le tampon HBS-EP. La réponse est enregistrée en unités résonance (RU) en fonction du temps. Les courbes noires correspondent aux données expérimentales et les courbes rouges à leur ajustement par le logiciel BIAevaluation 3.0 employant un modèle d'interaction 1:1 avec transport de masse. A. IFN γ WT, B. IFN γ S137, C. IFN γ S139, D. IFN γ S140, E. IFN γ Δ136, F. IFN γ SD2, G. IFN γ S125, H. IFN γ S128, I. IFN γ S129, J. IFN γ S130, K. IFN γ S131, L. IFN γ SD1.

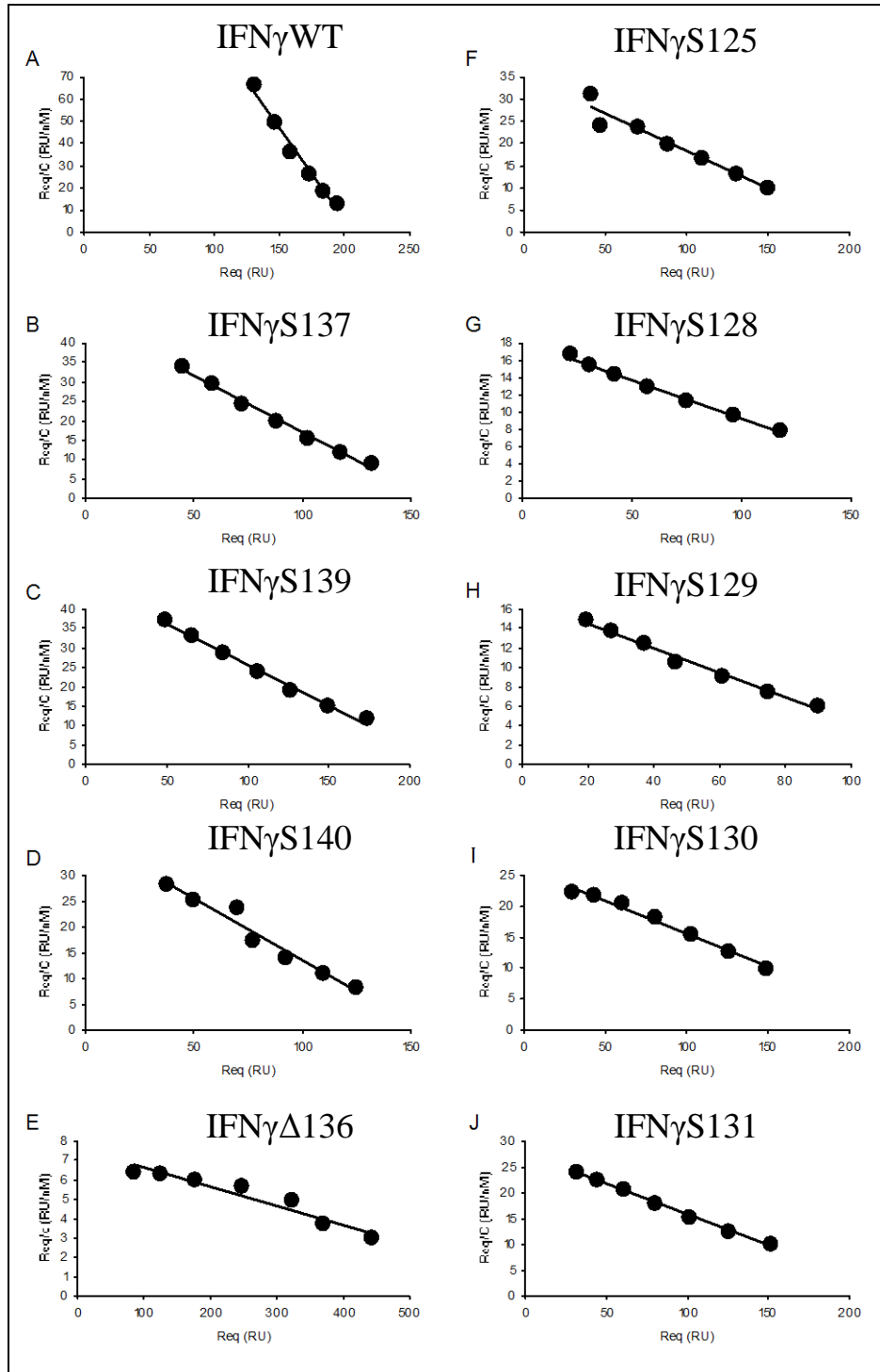


Figure 65 : Analyse de l'interaction IFN γ :Hp *via* la linéarisation de Scatchard.

La quantité d'IFN γ immobilisée par l'Hp à l'équilibre (Req) et la concentration de l'IFN γ (C) sont utilisées pour déterminer les constantes d'affinité K_D *via* la linéarisation de Scatchard, ici représentée. A. IFN γ WT, B. IFN γ S137, C. IFN γ S139, D. IFN γ S140, E. IFN γ Δ 136, F. IFN γ S125, G. IFN γ S128, H. IFN γ S129, I. IFN γ S130, J. IFN γ S131.

- **Interaction des mutants en séries et celles de délétion avec l'Hp**

Afin de caractériser l'importance des domaines D1 et D2 entiers, nous avons analysé l'interaction de l'IFN γ SD1, de l'IFN γ SD2, de l'IFN γ Δ 136 et de l'IFN γ Δ 124 avec l'Hp immobilisée. Avec la gamme de concentration habituellement utilisée, aucune interaction n'a été observée.

Une augmentation des concentrations d'un facteur dix (0-150 nM) est nécessaire pour obtenir une interaction entre l'IFN γ SD2 ou l'IFN γ Δ 136 et l'Hp. L'analyse de la constante d'affinité par la linéarisation de Scatchard n'est pas possible pour ces deux mutants, dans les conditions d'injection d'IFN γ habituellement utilisées puisque leur association avec l'Hp n'atteint pas l'équilibre après 5 min d'injection de l'IFN γ à 60 μ L/min. C'est pourquoi nous avons ralenti le débit de l'injection de 60 μ L/min à 5 μ L/min, de manière à atteindre l'équilibre d'association de ce dernier avec l'Hp et de pouvoir déterminer sa constante d'association *via* la linéarisation de Scatchard. Son affinité ainsi déterminée ($K_D = 114,3 \pm 17,3$ nM) s'avère environ cent fois inférieure à celle de l'IFN γ WT.

En revanche, même l'utilisation de l'IFN γ SD1 et de l'IFN γ Δ 124, aux concentrations cent fois supérieures à celles habituellement utilisées, c'est-à-dire entre 0 nM et 1500 nM, ne permet pas de détecter une interaction entre ces mutants et l'Hp. Il semble donc que les mutants IFN γ SD1 et IFN γ Δ 124 sont dépourvus de la capacité d'interaction avec l'IFN γ aux concentrations utilisées.

Nous avons également comparé la cinétique de l'interaction avec l'Hp de l'IFN γ Δ 136 et celle de l'IFN γ WT afin de comprendre la diminution de l'affinité de ce premier pour l'Hp. Cette cinétique démontre une forte diminution de la constante d'association de l'IFN γ Δ 136 ($k_a = 8,85 \cdot 10^3 \pm 1,43 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) par rapport à celle de l'IFN γ WT ($k_a = 8,90 \cdot 10^9 \pm 4,86 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) indiquant que ce mutant s'associe moins rapidement avec l'Hp que l'IFN γ WT. Cependant, la constante de dissociation de l'IFN γ Δ 136 ($k_d = 114 \pm 17 \text{ s}^{-1}$) diffère moins de celle de l'IFN γ WT ($k_d = 5,99 \pm 3,29 \text{ s}^{-1}$) que sa constante d'association. La diminution d'affinité pour l'Hp de l'IFN γ Δ 136 provient donc majoritairement de la baisse de l'association de celui-ci avec l'Hp. Néanmoins, il faut noter que ces constantes d'association sont biaisées par le transport de masse.

Ces tests d'interaction avec l'Hp immobilisée mettent en avant que les deux domaines basiques D1 et D2 sont importants pour l'interaction IFN γ :Hp, mais que seul le domaine D1 est essentiel pour l'interaction. Sur la figure 66 sont représentées les constantes d'affinité déterminées par la linéarisation de Scatchard pour l'IFN γ WT et les mutants utilisés. Sur le tableau 6 récapitule les constantes d'affinité et des paramètres cinétiques de l'interaction.

Cependant, comme mentionné dans le paragraphe précédent, les constantes d'association sont peu fiables du fait du transport de masse.

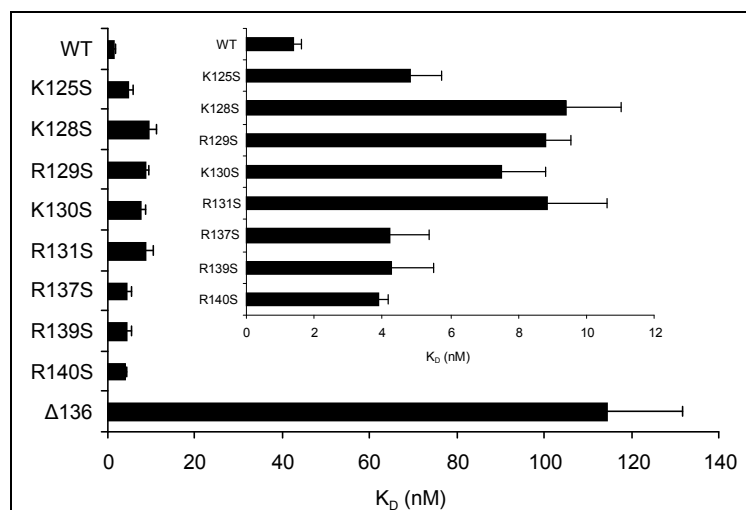


Figure 66 : Histogramme de l'affinité entre l'IFN γ et mutant avec l'Hp immobilisée.

L'IFN γ WT et mutants sont injectés sur une surface contenant de l'Hp, immobilisée comme décrit dans la figure 64. La constante d'affinité (K_D) de l'interaction entre l'IFN γ et l'Hp immobilisée est déterminée par la linéarisation de Scatchard, représentée sur la figure 65. Toutes les expériences ont été effectuées en triplicate.

IFN γ	K_{Deq} (nM)	σ (nM)	K_{Dcin} (nM)	σ (nM)	k_a (M ⁻¹ .s ⁻¹)	σ (M ⁻¹ .s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	σ (s ⁻¹)
WT	1,41	0,227	1,41	0,190	8,90E+09	4,86E+09	5,99E+00	3,29E+00
mutant poncutels D1								
S125	4,83	0,914	5,14	0,788	1,47E+10	1,37E+10	5,51E+01	4,74E+01
S128	9,39	1,641	5,51	5,476	2,15E+07	9,53E+06	1,55E-01	5,74E-02
S129	8,81	0,722	4,77	5,718	4,35E+06	7,96E+05	3,79E-02	7,20E-03
S130	7,50	1,278	4,39	4,401	1,18E+10	1,13E+10	5,01E+01	5,13E+01
S131	8,84	1,765	5,30	5,003	3,53E+09	1,55E+09	9,32E+00	4,73E+00
mutant poncutels D2								
S137	4,23	1,133	2,68	2,189	3,36E+08	2,79E+08	6,26E-01	5,11E-01
S139	4,27	1,246	2,76	2,139	4,42E+10	2,42E+10	6,64E+01	3,34E+01
S140	3,89	0,300	2,09	2,535	3,11E+10	4,49E+10	8,31E+01	1,20E+02
mutant de délétion								
$\Delta 136$	114,30	17,300	89,16	8,196	8,85E-03	1,34E-03	1,14E+02	1,74E+01

Tableau 6 : Tableau récapitulatif de l'étude de l'interaction de l'IFN γ avec l'Hp par SPR.

Toutes les expériences ont été effectuées en triplicate. Le K_{Deq} correspond à la constante d'affinité déterminée par la linéarisation de Scatchard (figure 65 et 66). Le K_{Dcin} correspond à la constante d'affinité déterminée *via* la cinétique de l'interaction par ajustement des sensorgrammes obtenues (figure 64). Cet ajustement a été effectué par le logiciel BIAevaluation 3.0, qui détermine la constante d'association k_a , la constante de dissociation k_d pour calculer la constante d'affinité K_{Dcin} . σ représente la déviation standard. Les ajustements des courbes sont caractérisés par des valeurs χ^2 allant de 2,3 à 11,8.

I.4.b. Analyse de l'interaction de l'IFN γ avec l'IFN γ R

Les HS sont capables d'inhiber l'interaction de l'IFN γ avec l'IFN γ R [80] suggérant que les certains résidus sont impliqués dans l'interaction de l'IFN γ avec ses deux ligands. C'est pour cette raison que nous avons déterminé l'implication du domaine C-terminal dans l'interaction IFN γ :IFN γ R par mesure de l'affinité de l'IFN γ WT et mutants pour son récepteur par SPR.

• Immobilisation de l'IFN γ R

L'IFN γ R a été immobilisé sur une sensor chip de la même façon que l'Hp, c'est-à-dire par le biais de l'interaction de la streptavidine avec la biotine (figure 67). Deux points sont importants à souligner quant à l'immobilisation du récepteur-biotinylé. Seule la partie extracellulaire de l'IFN γ R α a été immobilisée. Ceci étant suffisant pour imiter l'interaction de l'IFN γ avec son récepteur *in vivo*, car l'IFN γ interagit seulement de façon directe avec l'IFN γ R α et non pas avec l'IFN γ R β . De plus, cette interaction a lieu sur la surface cellulaire et par conséquent seule la partie extracellulaire de l'IFN γ R α est impliquée dans l'interaction. L'IFN γ R α est biotinylé par l'oxydation des cis-hydroxydes de ses glycanes en aldéhyde suivie de la condensation en hydrazone stable de l'aldéhyde de l'IFN γ R α et de la biotine-hydrazide. Ces sites de glycosylation se trouvent éloignés du site d'interaction de l'IFN γ et ainsi l'immobilisation *via* ces glycosylations ne masque ni ne gêne ce site d'interaction.

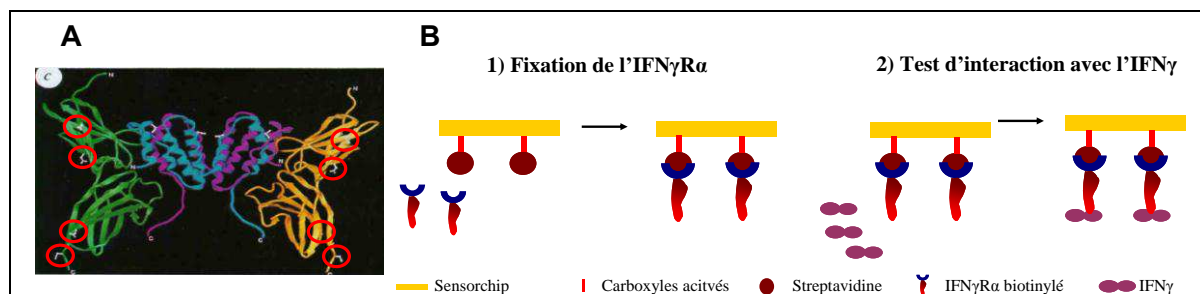


Figure 67 : Biotinylation de l'IFN γ R α et fixation sur la sensor chip.

Site de glycosylation de l'IFN γ R α . Structure du complexe entre l'IFN γ et l'IFN γ R α obtenue par cristallographie au rayon X (D'après Walter 1995 [39]). En vert et jaune sont illustrés l'IFN γ R α interagissant chacun avec un monomère de l'IFN γ , illustré en bleu et en violet. Les sites de glycosylation sont entourés en rouge. **B. Schéma de la fixation de la partie extracellulaire de l'IFN γ R α .** La streptavidine est immobilisée de la même façon que pour l'immobilisation de l'Hp-biotinylée puis l'IFN γ R préalablement biotinylé est fixé sur la streptavidine immobilisée. Pour des tests d'interaction avec l'IFN γ , ce dernier est apporté par cartouche microfluidique sur la sensor chip contenant de l'IFN γ R α immobilisé.

- **Interaction de l'IFN γ WT et des mutants ponctuels avec l'IFN γ R α**

L'importance du domaine C-terminal de l'IFN γ pour l'interaction avec l'IFN γ R α est déterminée de la même façon que pour l'interaction avec l'Hp. Pour cela, les constantes d'affinité, de l'IFN γ WT et de tous les mutants, ont été déterminées avec la méthode de Scatchard pour une gamme de concentration entre 0 nM et 15 nM de l'IFN γ injecté sur une sensor chip contenant de l'IFN γ R α immobilisé (figure 68).

L'affinité de l'IFN γ WT pour l'IFN γ R ($K_D = 0,59 \pm 0,12$ nM) est presque identique à celle mesurée par Sadir *et al.*, 1998 ($K_D = 0,68$ nM) utilisant le même système de mesure d'affinité [80]. Cette valeur est aussi similaire à celle qui caractérise l'affinité de l'IFN γ pour son récepteur présent à la surface des cellules [382].

La perte d'un résidu basique du domaine C-terminal de l'IFN γ n'altère pas de façon significative l'affinité de l'IFN γ pour l'IFN γ R (figure 70 et 71 et tableau 7) En effet les constantes d'affinité mesurées pour les mutants ponctuels sont similaires à celle de l'IFN γ WT : K_D (K¹²⁵) $0,58 \pm 0,042$ nM, K_D (K¹²⁸) $= 0,58 \pm 0,010$ nM , K_D (R¹²⁹) $= 0,64 \pm 0,134$ nM, K_D (K¹³⁰) $= 0,82 \pm 0,016$ nM, K_D (R¹³¹) $= 0,62 \pm 0,072$ nM, K_D (R¹³⁷) $= 0,38 \pm 0,035$ nM , K_D (R¹³⁹) $= 0,53 \pm 0,139$ nM et K_D (R¹⁴⁰) $= 0,64 \pm 0,182$ nM. Ainsi, malgré le fait que l'affinité de l'IFN γ pour l'Hp et pour l'IFN γ R soit du même ordre de grandeur, l'importance du domaine C-terminal pour ces deux interactions n'est pas la même. En effet, contrairement à l'interaction de l'IFN γ avec l'Hp la contribution de chaque résidu basique particulier ne semble pas individuellement importante pour l'interaction de l'IFN γ avec l'IFN γ R (tableau 7).

- **Interaction des mutants en séries et celles de délétion avec l'IFN γ R α**

Malgré le fait que la présence de chaque résidu basique de l'extrémité C-terminale de l'IFN γ ne semble pas essentielle pour l'interaction IFN γ :IFN γ R, nous avons recherché l'importance des domaines D1 et D2 entiers pour celle-ci. L'absence du domaine D2 ne change pas l'affinité de l'IFN γ pour l'IFN γ R. En effet, l'affinité mesurée pour les mutants IFN γ Δ 136 et IFN γ SD2 pour l'IFN γ R - K_D (Δ 136) $= 0,75$ nM, K_D (SD2) $= 1,27 \pm 0,024$ nM - est du même ordre de grandeur que celle mesurée pour l'IFN γ WT. Cependant, l'absence du domaine D1 diminue légèrement l'affinité pour l'IFN γ R puisque l'affinité du mutant IFN γ SD1 - K_D (SD1) $= 3,57 \pm 0,023$ nM - est légèrement supérieure à celle de l'IFN γ WT.

L'identification des sites d'interaction de l'IFN γ sur l'IFN γ R ont démontré l'implication de plusieurs sites d'interaction. Tout d'abord, les régions 1 à 42 et 108 à 124 ont été identifiées en tant que telle à partir de la structure cristallographique du complexe entre l'IFN γ et

l'IFN γ R [39]. L'implication de la partie C-terminale de l'IFN γ n'a pas été directement identifiée *via* la structure du complexe car cette partie est non visible. Sa participation a été néanmoins suggérée par l'utilisation d'AcM dirigés contre cette séquence de la protéine et sa présence semble augmenter l'affinité de l'IFN γ pour l'IFN γ R [80]. Les résultats des tests d'interaction IFN γ :IFN γ R sont cohérents avec cette identification du site d'interaction puisque nous observons que même en absence d'un des deux domaines basiques de l'IFN γ , la cytokine est encore capable de lier son récepteur, malgré une légère diminution de son affinité.

De plus, nous observons également que la perte du domaine D2 diminue la vitesse de d'association du complexe IFN γ :IFN γ R, comme cela a déjà été démontré par Sadir *et al.* [80]. Cependant, sensorgrammes n'ont pas pu être ajustés correctement du fait du transport de masse (figure 68). De ce fait, les vitesses d'association de l'IFN γ WT et de l'IFN γ SD2 ne peuvent pas être déterminées avec exactitude.

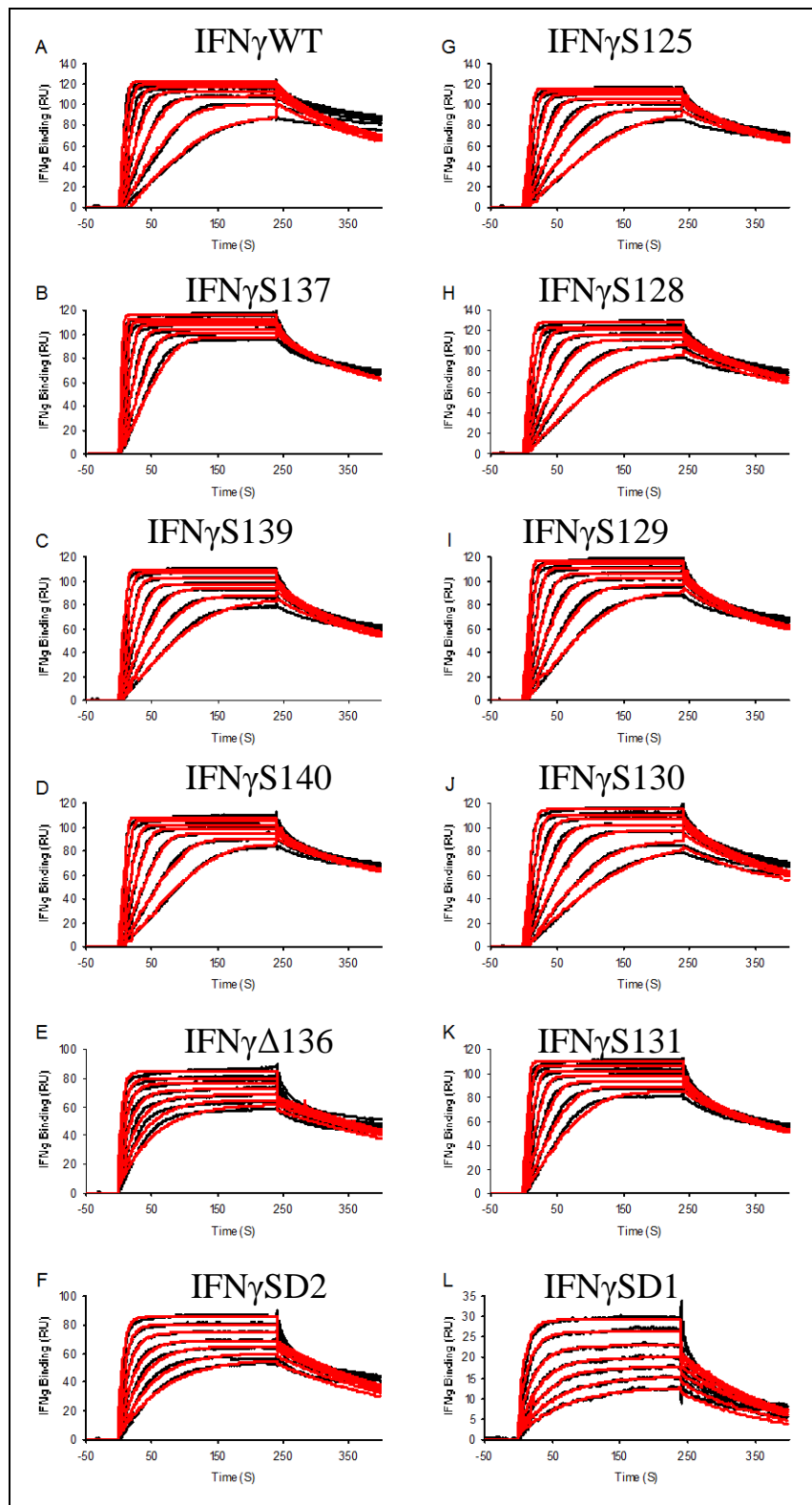


Figure 68 : Sensorgrammes de l'interaction de l'IFN γ avec de l'IFN γ R immobilisé.

L'IFN γ WT et mutants (0-15 nM) sont injectés sur une sensor chip, contenant l'IFN γ R α immobilisé, à un débit de 60 μ L/min pendant 5 min, l'IFN γ est ensuite remplacé par le tampon HBS-EP. La réponse est enregistrée en unités de résonance (RU) en fonction du temps. Les courbes noires correspondent aux données expérimentales et les courbes rouges à leur ajustement par le logiciel BIAevaluation 3.0 employant un modèle d'interaction 1:1 avec transport de masse. A. IFN γ WT, B. IFN γ S137, C. IFN γ S139, D. IFN γ S140, E. IFN γ Δ 136, F. IFN γ SD2, G. IFN γ S125, H. IFN γ S128, I. IFN γ S129, J. IFN γ S130, K. IFN γ S131, L. IFN γ SD1.

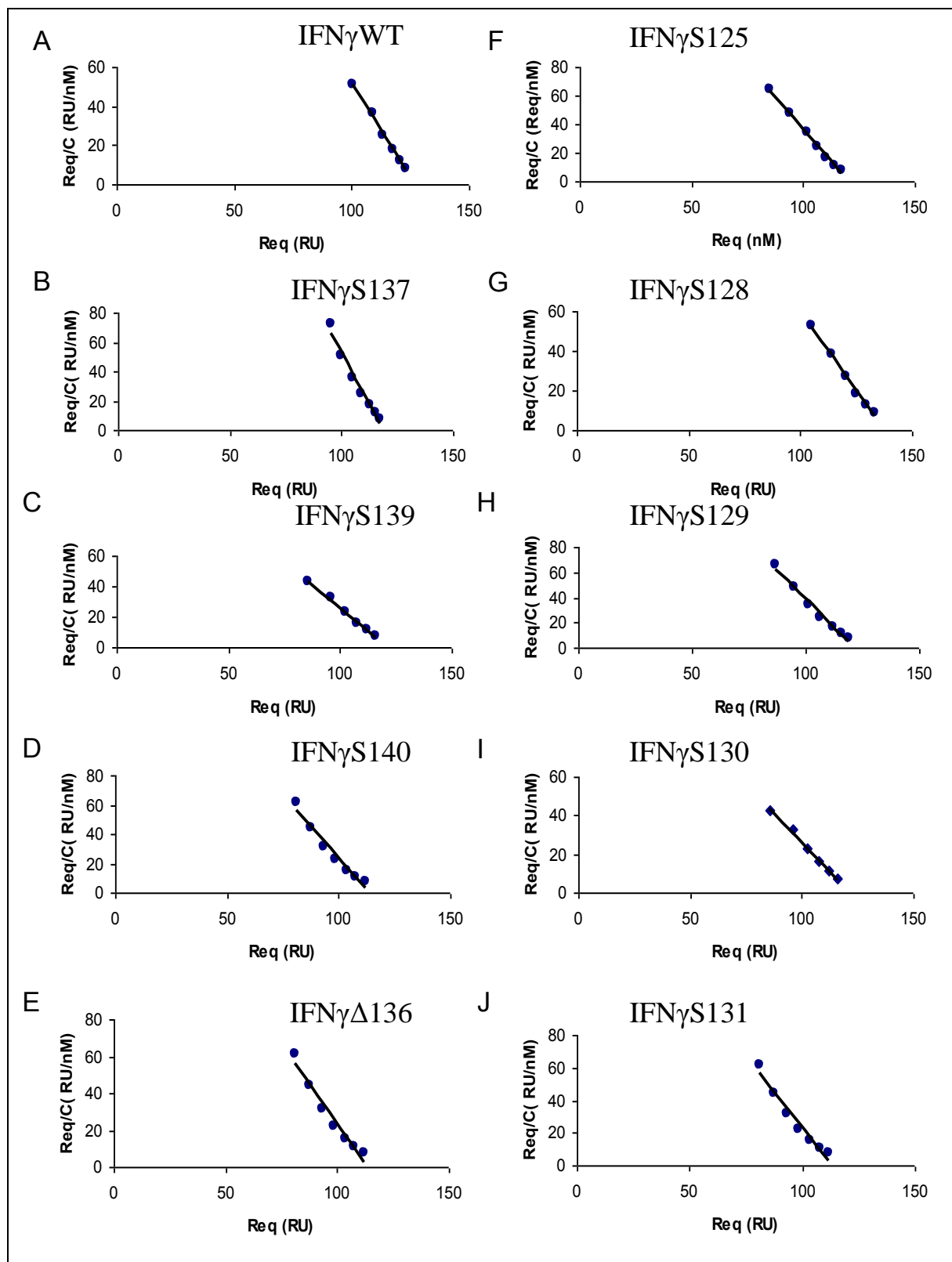


Figure 69 : Analyse de l'interaction IFN γ :IFN γ R *via* la linéarisation de Scatchard.

La quantité d'IFN γ immobilisée par l'IFN γ R à l'équilibre (Req) et la concentration de l'IFN γ (C) sont utilisées pour déterminer les constantes d'affinité K_D *via* la linéarisation de Scatchard, ici représentée. A. IFN γ WT, B. IFN γ S137, C. IFN γ S139, D. IFN γ S140, E. IFN γ Δ 136, F. IFN γ S125, G. IFN γ S128, H. IFN γ S129, I. IFN γ S130, J. IFN γ S131.

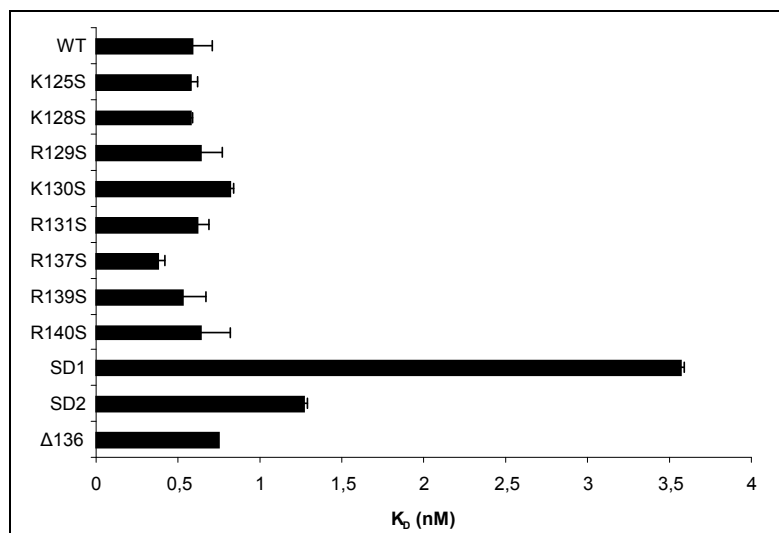


Figure 70 : Histogramme de l'affinité entre l'IFN γ et mutant avec l'IFN γ R immobilisé par Scatchard
 L'IFN γ WT et mutants sont injectés sur une surface contenant de l'IFN γ R, immobilisé comme décrit dans la figure 68. La constante d'affinité (K_D) de l'interaction entre l'IFN γ et l'IFN γ R immobilisé est déterminée par la méthode de Scatchard, représentée sur la figure 65. Toutes les expériences ont été effectuées en triplicate.

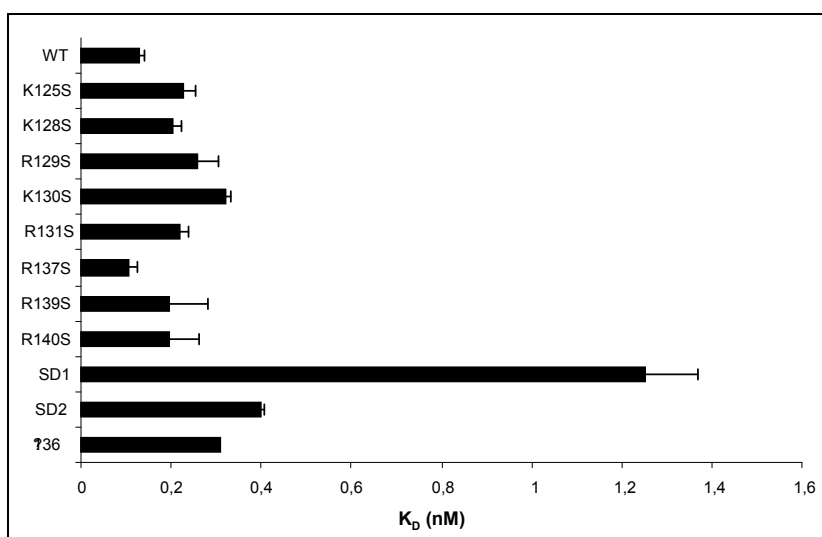


Figure 71 : Histogramme de l'affinité entre l'IFN γ et mutant avec l'IFN γ R immobilisé *via* la cinétique.
 L'IFN γ WT et mutants sont injectés sur une surface contenant de l'IFN γ R, immobilisé comme décrit dans la figure 68. La constante d'affinité (K_D) de l'interaction entre l'IFN γ et l'IFN γ R immobilisé est déterminée par l'ajustement des courbes par le logiciel BIAevaluation 3.0. Ce logiciel détermine la constante d'affinité K_D par le rapport entre la constante de dissociation k_d et la constante d'association k_a . Les ajustements des courbes sont caractérisés par des valeurs χ^2 allant de 0,38 et 13,9. Toutes les expériences ont été effectuées en triplicate.

Les constantes d'affinité déterminées *via* la cinétique de l'interaction (figure 71) de l'IFN γ avec l'IFN γ R sont relativement fiables puisque les erreurs standard sont acceptables et l'ajustement des courbes semble correct (figure 68). Ceci n'était d'ailleurs pas le cas de celles déterminées pour l'interaction de l'IFN γ avec l'Hp (figure 64) puisque pour cette interaction, le transport de masse était trop important empêchant le bon ajustement des courbes.

Les affinités (K_D cin, figure 71 et tableau 7) déterminées *via* la cinétique d'interaction IFN γ :IFN γ R sont plus basses que celles déterminées par la linéarisation de Scatchard. Néanmoins, on remarque les mêmes tendances d'affinité confirmant les conclusions quant à l'importance du domaine C-terminale pour l'interaction IFN γ :IFN γ R.

IFN γ	K_{Deq} (nM)	σ (nM)	K_{Dcin} (nM)	σ (nM)	k_a (M ⁻¹ .s ⁻¹)	σ (M ⁻¹ .s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	σ (s ⁻¹)
WT	0,59	0,120	0,13	0,0119	2,86E+07	8,67E+06	3,66E-03	8,54E-04
mutant poncutels D1								
S125	0,58	0,042	0,23	0,025	3,00E+07	1,34E+07	6,66E-03	2,29E-03
S128	0,58	0,010	0,20	0,020	2,60E+07	3,54E+05	5,30E-03	4,38E-04
S129	0,64	0,134	0,26	0,046	3,53E+07	8,91E+06	8,94E-03	6,72E-04
S130	0,82	0,016	0,32	0,0128	1,74E+07	6,36E+06	5,61E-03	2,26E-03
S131	0,62	0,072	0,22	0,019	3,23E+07	1,66E+07	6,88E-03	3,01E-03
mutant poncutels D1								
S137	0,38	0,035	0,11	0,019	9,73E+07	3,78E+07	9,93E-03	2,22E-03
S139	0,53	0,139	0,20	0,085	5,41E+07	2,69E+07	9,43E-03	6,51E-04
S140	0,64	0,182	0,20	0,066	3,64E+07	2,74E+07	6,18E-03	2,93E-03
Mutants en série								
SD1	3,57	0,023	1,25	0,120	6,85E+06	1,36E+06	8,60E-03	2,55E-03
SD2	1,27	0,024	0,40	0,0102	1,02E+07	1,39E+06	4,06E-03	2,90E-04
mutant de délétion								
Δ 136	0,75		0,31		1,33E+07		4,12E-03	

Tableau 7 : Tableau récapitulatif de l'interaction de l'IFN γ avec l'IFN γ R par SPR.

Toutes les expériences ont été effectuées en triplicate. Le K_D eq correspond à la constante d'affinité déterminée par la linéarisation de Scatchard (figure 69 et 70). Le K_D cin correspond à la constante d'affinité déterminée *via* la cinétique de l'interaction par ajustement des sensorgrammes obtenues (figure 68). Cet ajustement a été effectué par le logiciel BIAevaluation 3.0, qui détermine la constante d'association k_a , la constante de dissociation k_d pour calculer la constante d'affinité K_D cin. σ représente la déviation standard. Les ajustements des courbes sont caractérisés par des valeurs χ^2 allant de 0,38 et 13,9.

Somme toute, le domaine D2 ne semble pas du tout impliqué dans l'interaction IFN γ :IFN γ R. Cependant, la présence du domaine D1 augmente l'affinité de l'IFN γ pour l'IFN γ R sans pour autant être essentiel pour cette interaction. Sur la figure 70 sont représentées les constantes d'affinité déterminée par la linéarisation de Scatchard et sur la figure 71 celles déterminées par la cinétique de l'interaction pour l'IFN γ WT et les mutants utilisés. Le tableau 7 récapitule les constantes d'affinité et les paramètres cinétiques de l'interaction. Cependant, de la même manière que pour l'interaction IFN γ :Hp, les constantes d'association déterminées pour l'interaction IFN γ :IFN γ R sont peu fiables du fait du transport de masse.

I.5. Aspects thermodynamiques de l'interaction de l'IFN γ avec les HS

Dans la première partie de ce chapitre, les AA impliqués dans l'interaction avec les HS ont été déterminés. Ces résidus sont maintenant identifiés ainsi que leur contribution pour l'affinité vis-à-vis des HS ou de l'IFN γ R. Afin de compléter l'analyse de l'interaction de l'IFN γ avec l'HS au niveau moléculaire, l'analyse thermodynamique de cette interaction est nécessaire. Une méthode de choix est la calorimétrie de titration isotherme (ITC).

Depuis une décennie [383-384], l'ITC s'est développée et s'avère être une méthode clé pour l'étude d'interactions en biologie. En effet, des interactions entre une protéine et des ligands très divers comme d'autres protéines, des glucides - telle que les HS - et des acides nucléiques peuvent être étudiées. L'ITC est la seule méthode qui permette d'obtenir tous les paramètres thermodynamiques de l'interaction en une seule expérience. Il est effectivement possible de mesurer et de calculer la constante d'affinité (K_D), la stœchiométrie de l'interaction (n), la variation d'énergie libre de Gibbs (ΔG), la variation d'entropie (ΔS) et la variation d'enthalpie (ΔH). La microcalorimétrie est une technique très puissante qui a l'avantage de caractériser une interaction sans immobilisation ni marquage des partenaires d'interaction. En revanche, elle nécessite une quantité de ligand et d'analyte non négligeable [329, 383, 385]. L'ITC est largement employée pour l'étude d'interactions entre des protéines (ou peptides spécifiques) et l'HS ou l'Hp [280-281, 340, 386-388].

I.5.a. Détermination de la stœchiométrie de l'interaction

Dans une expérience d'ITC « classique », le réactif se trouve dans la seringue et est référencé comme ligand. Il s'agit en général d'une petite molécule. La protéine ciblée, souvent de plus haut poids moléculaire que le ligand, est appelée analyte et est présente dans la cellule. C'est dans cette configuration que la titration du dp8 (dans la seringue) avec l'IFN γ (dans la cellule) a été effectuée.

La courbe de titration correspondant à l'injection du dp8 d'Hp 112,5 μ M dans l'IFN γ WT 20 μ M est illustrée en figure 72. Elle est sigmoïdale et est caractéristique d'une réaction exotherme. Au début de la titration, des quantités d'apport de chaleur importantes sont observées correspondant à la formation du complexe IFN γ :dp8. Ceci est dû au fait qu'en début de titration l'IFN γ se trouve en excès. Cependant, en fin de titration, seule la chaleur de dilution du dp8 peut être observée car tous les sites d'interactions pour les dp8 sur l'IFN γ sont désormais saturés et le dp8 injecté ne se fixe plus sur l'IFN γ .

Il est à noter que dans tous les essais de microcalorimétrie, la concentration de l'IFN γ sera exprimée en concentration de monomère. Nous avons fait ce choix afin de mesurer la stœchiométrie entre le dp8 et un monomère d'IFN γ mais également afin de comparer nos mesures d'affinité par microcalorimétrie avec celles obtenues par l'utilisation d'un capteur fluorescent comme présentée en chapitre II.

Le logiciel Origin nous a permis d'intégrer les chaleurs de dilution et d'ajuster les courbes afin d'en extraire les paramètres thermodynamiques de la réaction. Pour que ces paramètres soient extraits avec exactitude, la courbe doit être sigmoïdale. Le paramètre de Wiseman [389] « c », détermine la forme d'une courbe par un chiffre. Afin d'obtenir des paramètres thermodynamiques fiables, il doit être compris entre 10 et 100 [389-390]. Il est défini par la relation suivante :

$$c = n[M]_t K_A$$

avec n la stœchiométrie du complexe, $[M]_t$ la concentration de ligand totale et K_A la constante d'association à l'équilibre.

Pour la titration du dp8 dans l'IFN γ WT, ce paramètre de Wiseman est de 24. Par conséquent, les paramètres obtenus par cette titration peuvent être considérés comme exactes. Cette interaction est caractérisée par une stœchiométrie de 0,5, correspondant à l'interaction d'un dp8 par dimère de l'IFN γ . Ceci est surprenant car dans le modèle d'interaction proposé initialement [304] deux dp8 interagissent chacun avec une extrémité C-terminale de l'IFN γ , comme illustré sur la figure 74 à gauche. Nous proposons dans cette situation un complexe dans lequel les extrémités C-terminales de l'IFN γ se referment sur le même dp8, comme illustré sur la figure 74 à droite.

La constante de dissociation du complexe IFN γ :dp8 a été mesurée par microcalorimétrie et est de $410,25 \pm 0,59$ nM. Cette affinité est plus faible que celle mesurée par SPR ($K_D = 1,8$ nM) ou encore que celle décrit par Lortat-Jacob *et al.* mesurée par l'utilisation de l'IFN γ radiomarqué [314] ($K_D = 1,5$ nM). La diminution de l'affinité provient sûrement du fait qu'un dp8 interagit avec l'IFN γ par un seul domaine C-terminal de la protéine. En revanche, les longs fragments d'Hp (utilisés pour les mesures par SPR et dans l'étude mentionnée ci-dessous [314]) interagissent conjointement avec les deux domaines C-terminaux de l'IFN γ . Dans cette conformation un facteur d'avidité augmente l'affinité apparente. Cependant l'affinité mesurée par ITC ($K_D = 410,25$ nM) est beaucoup plus importante que celle mesurée en employant le peptide fluorescent ($K_D = 50$ μ M, paragraphe II.4), malgré l'utilisation dans les deux cas des dp8 issu d'Hp. La différence provient vraisemblablement du fait qu'en

microcalorimétrie un complexe IFN γ :dp8 1:2 est formé. Ce complexe ne peut pas être formé par le peptide C-terminal de l'IFN γ , dans ce cas seul un complexe IFN γ :dp8 1:1 peut être formé. Ceci expliquera l'affinité relativement faible observée par l'utilisation du peptide-fluorescent (voir paragraphe II.4).

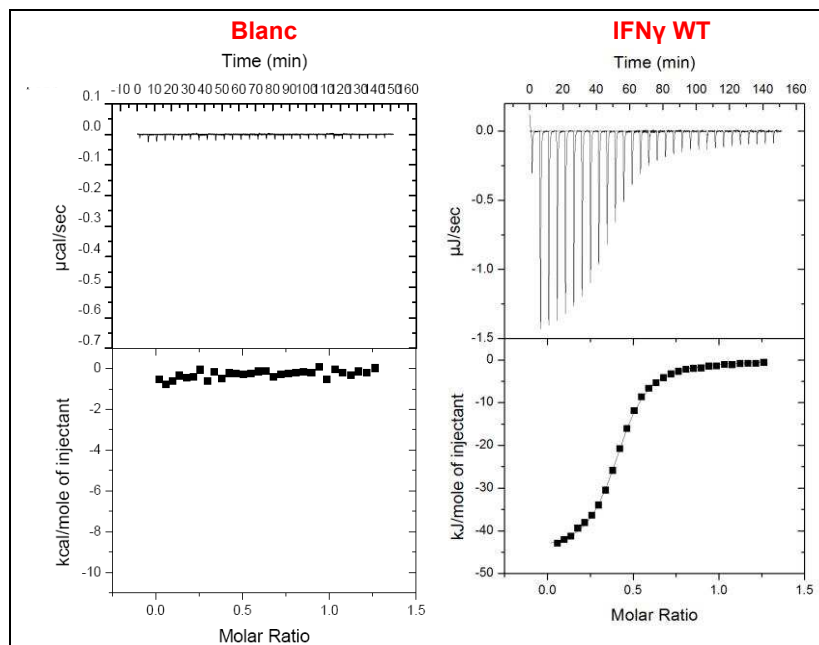


Figure 72 : Courbes de microcalorimétrie de l'IFN γ WT avec les dp8.

Courbes de microcalorimétrie avec en haut les thermogrammes obtenus et en bas l'intégration de la chaleur totale libérée en fonction de la titration de ligand. **A gauche : Mesure de la chaleur de dilution.** Du dp8 (112,5 μ M) est titré dans une solution de tampon (PBS) afin de mesurer la chaleur de dilution. Elle est relativement petite et exotherme mais est tout de même incluse dans l'analyse finale. **A droite : titration de dp8 (112,5 μ M) dans l'IFN γ WT (20 μ M).** Les résultats sont ajustés par un modèle d'interaction 1:1 et la ligne continue représente le meilleur ajustement possible.

Afin de favoriser la formation d'un complexe IFN γ :dp8 1:2 et de s'assurer de la validité de la stoechiométrie identifiée par l'ITC « classique », nous avons mené la titration « inverse » où l'IFN γ est titré dans une solution contenant du dp8 [383, 391].

Dans ce cas, l'IFN γ WT 310 μ M est titré dans une solution contenant du dp8 20 μ M. Pour cette titration une courbe sigmoïdale, représentée sur la figure 73, est obtenue. Elle a été caractérisée par une valeur « c » de 43 ce qui indique que les paramètres obtenus par l'ajustement de la courbe sont valides. Dans le cas d'une titration de protéine dans du ligand, la chaleur de dilution est parfois non négligeable, c'est pour cette raison que nous l'avons mesurée par la titration de l'IFN γ dans du tampon. Cette chaleur de dilution de l'IFN γ est faible et légèrement endotherme, contrairement à la chaleur de dilution de l'oligosaccharide qui est exotherme.

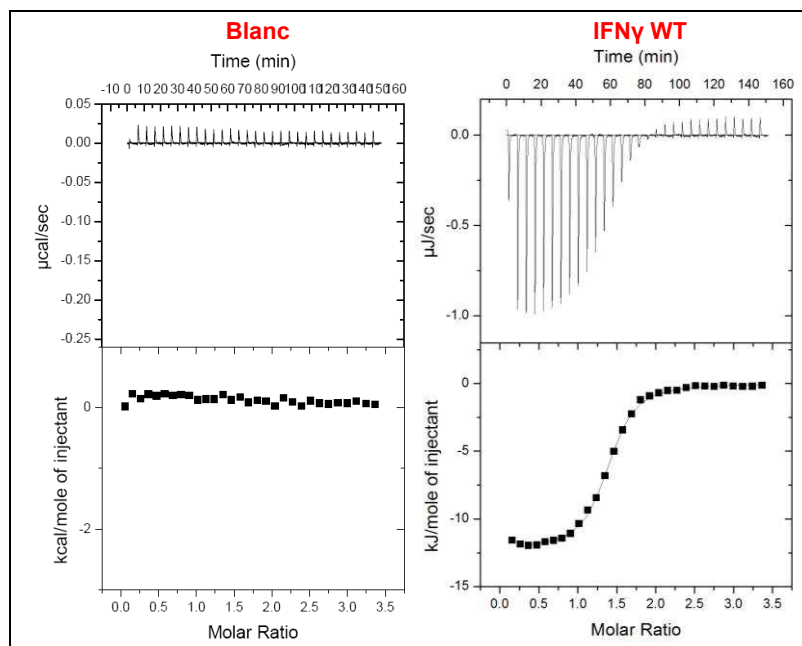


Figure 73 : Courbes de microcalorimétrie en sense « inverse » de l'IFN γ WT avec les dp8.

Courbes de microcalorimétrie avec en haut les thermogrammes obtenus et en bas l'intégration de la chaleur totale libérée en fonction de la titration de ligand. **A gauche : Mesure de la chaleur de dilution.** L'IFN γ WT 310 μ M est titré dans du PBS afin de mesurer la chaleur de dilution. Elle est relativement faible et légèrement endotherme mais est tout de même incluse dans l'analyse finale. **A droite : Titration de de l'IFN γ WT 310 μ M dans du dp8 20 μ M.** Les résultats sont ajustés par un modèle d'interaction 1:1 et la ligne continue représente le meilleur ajustement possible. Le ratio molaire dans l'ITC « inverse » est donc ici le rapport de la quantité de protéine sur la quantité d'HS.

La stœchiométrie déterminée par titration « inverse » est différente de celle calculée pour la titration « classique ». En effet, une stœchiométrie intermédiaire entre 0,5 et 1 ($n = 0,75$) a été obtenue. Deux complexes de stœchiométrie différente semblent coexister (figure 74). Le premier, identique à celui observé en ITC « classique » avec une stœchiométrie de 0,5. Le second, en accord avec le modèle proposé par Lortat-Jacob *et al.* [304], caractérisé par une stœchiométrie de 1, comprenant une interaction de deux dp8 par dimère d'IFN γ . Nous supposons qu'au début de la titration « inverse », où le dp8 se trouve en excès par rapport à l'IFN γ injecté, un complexe avec une conformation IFN γ :dp8 1:2 se forme. En revanche, à la fin de la titration le complexe IFN γ :dp8 1:1 pourrait se former puisque le dp8 n'est plus en excès par rapport à l'IFN γ . Cependant, dans la titration « classique » l'IFN γ n'est jamais en excès et seul le complexe IFN γ :dp8 1:1 sera probablement formé. Les stœchiométries mesurées confortent cette hypothèse.

Finalement, nous avons tenté de changer la conformation du complexe 1:1 en complexe 2:1 en apportant un excès considérable du ligand dp8 à l'IFN γ (présent dans la cellule). Cependant, nous ne sommes pas parvenus à observer un deuxième site d'interaction correspondant à l'ouverture des extrémités C-terminales de la protéine et à la complexation

d'un second dp8. Par conséquent le complexe 1:1 semble stable, même en présence d'un excès considérable du ligand dp8.

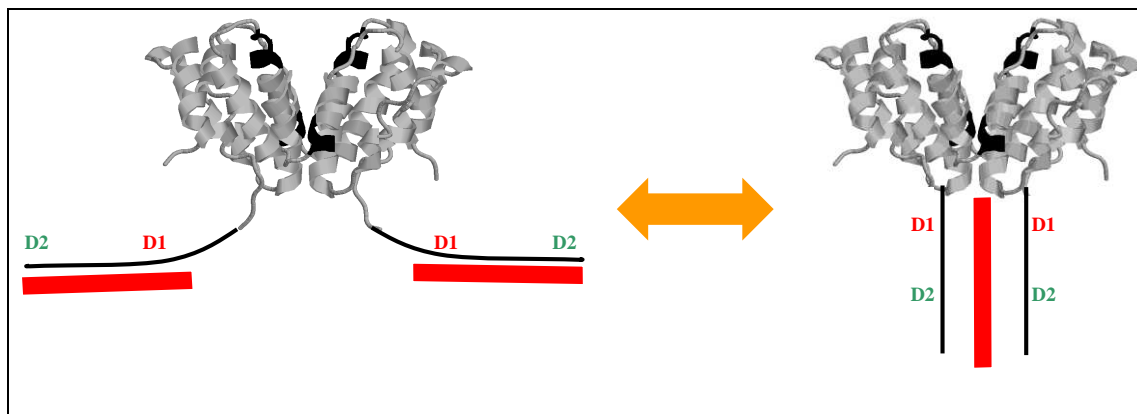


Figure 74 : Schéma des deux modèles d'interaction entre l'IFN γ et les dp8.

Suite à l'interaction de l'IFN γ WT avec le dp8 par ITC, deux modèles d'interaction sont plausibles. Une interaction avec une stœchiométrie IFN γ :dp8 1:1; cette configuration est retrouvée par l'ITC « classique » (à droite). Puis une interaction avec une stœchiométrie IFN γ :dp8 1:2 qui est partiellement retrouvée par l'ITC « inverse » (à gauche) et qui semble exister en même temps que l'interaction avec une stœchiométrie IFN γ :dp8 1:1. Dans la figure, les dp8 sont représentés par des bâtons rouges et le domaine C-terminal (dont la structure n'est pas connue) de l'IFN γ est ajouté à la structure sous forme d'un trait noir.

1.5.b. Contribution du domaine C-terminal de l'IFN γ pour l'interaction avec les HS

Afin de déterminer l'importance du domaine D2, région importante pour l'activité de la cytokine, dans l'interaction IFN γ :HS, nous avons titré du dp8 112,5 μ M dans l'IFN γ SD2 37,5 μ M (figure 77). Le thermogramme obtenu démontre une affinité beaucoup plus faible que celle observée entre l'IFN γ WT et les dp8. Aux concentrations employées, la courbe de titration intégrée ne peut pas être ajustée par le logiciel puisque caractérisées par une valeur « c » trop faible ($c < 10$). Afin d'obtenir une courbe exploitable, au moins 200 à 500 μ M d'IFN γ SD2 doit être employé si nous estimons que son affinité pour le dp8 est 20 à 100 fois moindre que celle mesurée pour l'IFN γ WT. Ces quantités sont trop importantes au vu des rendements de purification et des difficultés que nous avons rencontrées pour purifier ce mutant.

C'est pourquoi nous avons par la suite analysé l'interaction de l'IFN γ Δ 136 avec les dp8 afin de déterminer les contributions thermodynamiques du domaine D2 puisque dans ce mutant le domaine D2 est absent. Une forte augmentation des concentrations de protéine et de ligand s'est avérée nécessaire pour obtenir des courbes acceptables. En effet, pour la titration « classique » du dp8 1000 μ M a été titrés dans une solution contenant de l'IFN γ Δ 136 100 μ M et pour la titration « inverse » de l'IFN γ Δ 136 500 μ M a été titrés dans une solution contenant

du dp8 50 μM (figure 75). Avant de regarder les paramètres thermodynamiques en détail, représentés sur la figure 76 et spécifiés sur le tableau 8, nous avons calculé les valeurs « c » des courbes de titration de l'IFN $\gamma\Delta 136$ avec le dp8. Elles sont acceptables puisqu'une valeur de 10 pour la titration dans le sens « classique » et 4 pour la titration dans le sens « inverse » a été trouvée. Cette dernière valeur est un peu faible, mais une concentration de 500 μM de l'IFN $\gamma\Delta 136$ (correspondant à 8 mg/mL) a été employée. Afin d'améliorer la valeur de « c », le ligand et l'analyte devront être plus concentrés. Cependant concentrer encore plus la protéine pourrait engendrer sa précipitation. De plus les quantités nécessaires pour faire ces essais sont déjà élevées. Ainsi augmenter ces concentrations est dans notre cas impossible.

Dans les deux sens de la titration, l'affinité de l'IFN $\gamma\Delta 136$ pour les HS est plus faible que celle de l'IFN γWT (les courbes de titration de l'IFN $\gamma\Delta 136$ « classique » et « inverse » sont représentées sur la figure 75). Ceci est en accord avec nos mesures d'affinité par SPR. Cependant la différence est plus faible. En effet, par microcalorimétrie une différence d'affinité d'un facteur vingt est observée contre un facteur soixante par SPR.

Lorsqu'on compare les paramètres thermodynamiques de la titration en sens « inverse » de l'IFN $\gamma\Delta 136$, avec du dp8, par rapport à celle de l'IFN γWT , une diminution d'énergie libre de Gibbs entre l'IFN γWT et l'IFN $\gamma\Delta 136$ est observée. Ceci reflète la diminution d'affinité de l'IFN $\gamma\Delta 136$ pour les HS par rapport à l'IFN γWT . Au niveau thermodynamique, cette baisse provient d'une contribution moins favorable aussi bien de l'enthalpie que de l'entropie. Cependant, il reste à noter que dans cette configuration les deux complexes, illustrés sur le tableau 8, semblent coexister. La contribution de l'enthalpie et de l'entropie sont alors une moyenne pondérée de celle des deux complexes présents. Vu la complexité de l'interaction avec la formation de deux complexes différents, nous ne pouvons pas interpréter la participation du domaine D2 dans l'interaction avec les HS d'un point de vue thermodynamique.

Enfin, la titration du dp8 dans l'IFN γ (sens « classique »), montre des différences importantes entre les paramètres thermodynamiques de l'IFN γWT et ceux de l'IFN $\gamma\Delta 136$. Dans ce sens de titration, un seul complexe existe et est caractérisé par une stœchiométrie d'un dp8 par dimère d'IFN γ . Les deux titration sont caractérisées par des libérations d'énergie libre de Gibbs (réactions favorables).

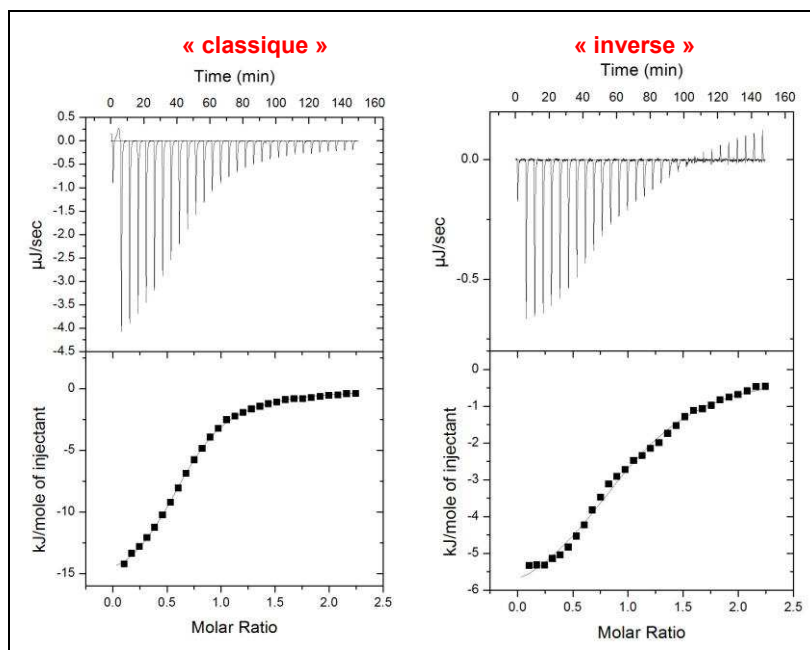


Figure 75 : Courbes de microcalorimétrie de l'IFN γ Δ 136 avec les dp8.

Courbes de microcalorimétrie avec en haut les thermogrammes obtenus et en bas l'intégration de la chaleur totale libérée en fonction de la titration de ligand. **A gauche : titration de dp8 1000 μ M dans l'IFN γ Δ 136 100 μ M. A droite : Titration de l'IFN γ Δ 136 500 μ M dans du dp8 50 μ M.** Les résultats sont ajustés par un modèle d'interaction 1:1 et la ligne continue représente le meilleur ajustement possible. Le ratio molaire dans l'ITC « inverse » est le rapport de la quantité de protéine sur la quantité d'HS contrairement à l'ITC « classique » où le rapport de la quantité d'HS sur la quantité de protéine est représenté.

Pour l'interaction du dp8 avec l'IFN γ WT, il y a une grande contribution enthalpique favorable ($\Delta H = -43,3 \pm 1,8$ J/mole), reflétant la formation de nombreuses forces d'interaction, comme les forces de Van der Waals, ioniques ou hydrophobes. Cependant, la contribution entropique de l'interaction est défavorable ($-T\Delta S = 6,86 \pm 1,80$ Jmole/kJ). Elle indique vraisemblablement deux contributions opposées. La première est la rigidification des deux partenaires lors de leur interaction apportant une contribution défavorable à l'entropie. La seconde est typique des interactions protéines-HS/Hp : elle est appelée l'effet polyélectrolyte [392] et concerne le relargage des contre-ions. Le dp8 d'Hp est associé aux ions sodium - dans une solution à concentration de sel physiologique - mais lorsqu'il s'associe à l'IFN γ , ses ions sont relâchés et gagnent en degrés de liberté. Cette libération d'ions génère une contribution favorable à l'entropie de l'interaction. En revanche, elle n'est pas suffisante pour palier à l'effet entropique défavorable dû à la rigidification des partenaires. Elle limite néanmoins la contribution défavorable de l'entropie à l'énergie libre de Gibbs.

En revanche, pour l'interaction du dp8 avec l'IFN γ Δ 136, la contribution enthalpique est favorable ($\Delta H = -18,02 \pm 1,42$ J/mole) mais moins importante. Ceci nous indique que moins de forces d'interactions sont présentes lors de leur interaction. Cependant, la contribution entropique est dans ce cas favorable ($-T\Delta S = -10,44 \pm 1,55$ Jmole/kJ), contrairement à celle de

l'IFN γ WT. Ceci provient probablement du fait que les deux partenaires d'interaction sont moins rigidifiés mais que les contre-ions sont tout de même libérés lors de l'interaction.

La différence thermodynamique entre l'interaction de l'IFN γ WT avec les dp8 par rapport à celle de l'IFN $\gamma\Delta$ 136 (par ITC « classique »), nous indique l'importance du domaine D2 pour cette interaction. Le domaine D2 semble augmenter le nombre de forces d'interaction entre ces partenaires (diminution du ΔH avec la perte du domaine D2). Cependant, ces interactions supplémentaires rigidifient les partenaires (augmentation du $-T\Delta S$ avec la perte du domaine D2). Somme toute, ces interactions supplémentaires semblent favorables pour la réaction malgré une perte de la contribution de l'entropie.

ITC	n (dp8:IFN γ)	K _D (μ M)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
Classique WT	0,435 \pm 0,025	0,4102 \pm 0,0006	-36,44 \pm 0,004	-43,36 \pm 1,81	6,87 \pm 1,80
Classique Δ136	0,599 \pm 0,080	10,36 \pm 0,51	-28,44 \pm 0,12	-18,02 \pm 1,42	-10,44 \pm 1,55
Inverse WT	0,749 \pm 0,014	0,61 \pm 0,17	-35,53 \pm 0,69	-11,72 \pm 0,54	-23,83 \pm 0,12
Inverse Δ136	0,854 \pm 0,119	14,72 \pm 4,85	-27,71 \pm 0,85	-8,15 \pm 1,37	-20,52 \pm 1,31

Tableau 8 : Données thermodynamiques de la titration IFN γ :dp8 par ITC « classique » et « inverse ».

Les données sont obtenues par ITC à 25°C d'une titration du dp8 112,5 μ M dans de l'IFN γ WT 20 μ M, nommée ITC «classique », puis d'une titration de l'IFN γ WT 310 μ M dans du dp8 20 μ M, nommée ITC « inverse ». Les déviations standards ont été calculées à partir de deux expériences indépendantes. La stœchiométrie est calculée en rapport de dp8 par monomère de l'IFN γ .

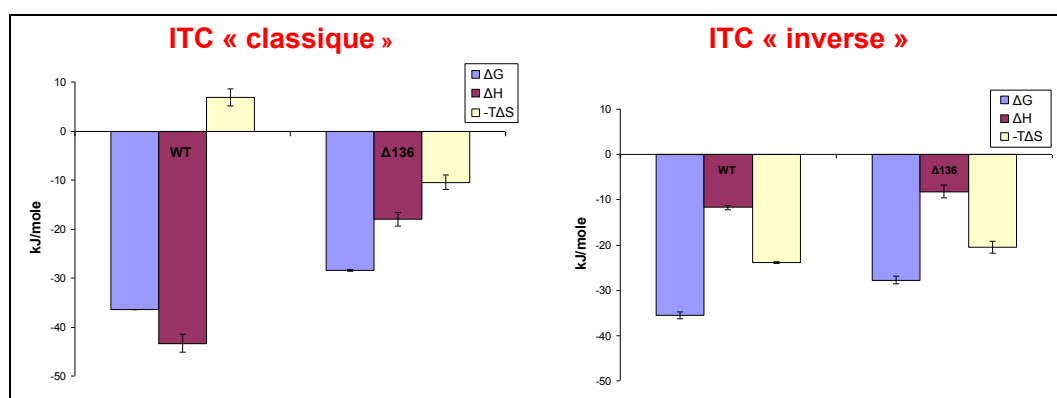


Figure 76 : Histogramme des paramètres thermodynamiques de l'interaction de l'IFN γ WT et l'IFN $\gamma\Delta$ 136 avec les dp8 issus d'Hp.

Les paramètres thermodynamiques de la titration du dp8 dans de l'IFN γ WT ou de l'IFN $\gamma\Delta$ 136, appelés ITC « classique » et ceux de la titration « inverse » sont déterminés en duplicata par des expériences indépendantes et analysés par un modèle d'interaction simple 1:1. Les conditions expérimentales sont détaillées dans le tableau 8. Toutes les interactions sont spontanées mais les contributions de l'enthalpie et de l'entropie sont très variables.

Enfin, nous avons également utilisé ce système pour déterminer l'importance du domaine D1 pour l'interaction de l'IFN γ avec l'Hp. Le thermogramme obtenu par titration du dp8 112,5 μ M dans de l'IFN γ SD1 40 μ M, illustré sur la figure 77, démontre une courbe analogue à celle obtenue pour l'IFN γ SD2. La même remarque que celle donnée sur pour l'IFN γ SD2 quant à la quantité de l'IFN γ SD1 nécessaire pour obtenir une courbe exploitable est valable. Ainsi cette titration ne permet pas d'apporter des paramètres thermodynamiques de l'interaction du le domaine D1 de l'IFN γ avec les HS. Cependant cet essai de microcalorimétrie démontre que la perte du domaine D1 diminue très fortement l'affinité pour les dp8. Ceci confirme alors les résultats obtenus par SPR qui démontrent que le domaine D1 est essentiel pour l'interaction de l'IFN γ avec les HS.

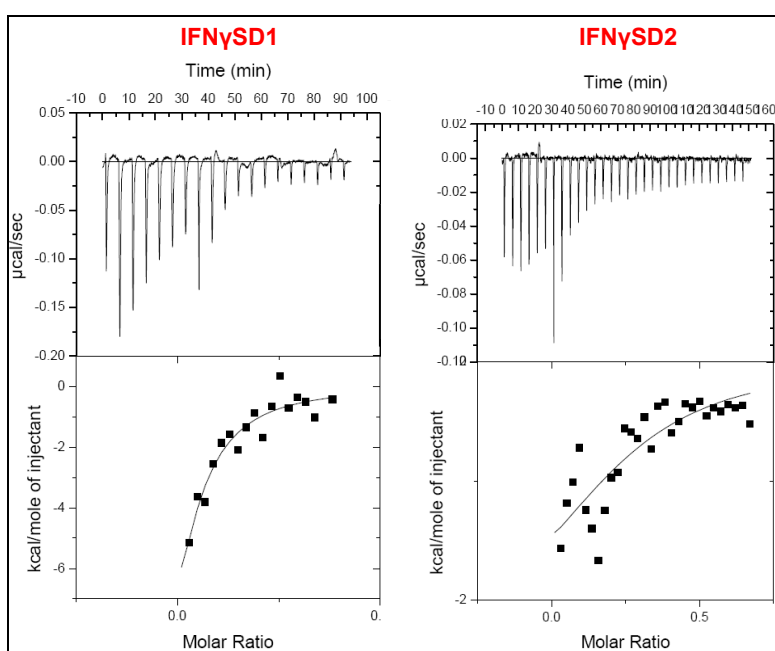


Figure 77 : Importance du domaine C-terminal de l'IFN γ pour l'interaction avec les dp8.

Courbes de microcalorimétrie avec en haut les thermogrammes obtenus et en bas l'intégration de la chaleur totale libérée en fonction de la titration de ligand. Du dp8 112,5 μ M est titré dans de l'IFN γ SD1 40 μ M et de l'IFN γ SD2 37,5 μ M. Malgré une concentration doublée des mutants IFN γ SD1 et IFN γ SD2 par rapport à celle utilisé pour l'IFN γ WT (figure 72), les courbes de titrations sont telles qu'une analyse correcte n'est pas possible.

1.5.c. Importance de la taille de l'oligosaccharide dans l'interaction avec l'IFN γ

Après avoir mis au point le système de mesure de l'interaction IFN γ :oligosaccharide par microcalorimétrie, nous avons voulu utiliser ce système pour confirmer la taille minimale d'oligosaccharide nécessaire pour lier l'IFN γ à haute affinité. Pour cela, du disaccharide, du tétrasaccharide et de l'octasaccharide sont employés pour mesurer leur affinité pour l'IFN γ . Sur les thermogrammes présentés sur la figure 78, aucune interaction de l'IFN γ avec du dp2

et seule une faible interaction avec du dp4 sont observées. En revanche, la titration de l'IFN γ avec du dp8 est caractérisée par une interaction significative. Ces expériences démontrent qu'un dp8 est la taille minimale pour interagir avec l'IFN γ . Ces résultats confirment ceux obtenus par « footprinting » [304] et par la synthèse d'un mime oligosaccharidique [320], où des dp8 interagissent de façon directe avec l'IFN γ .

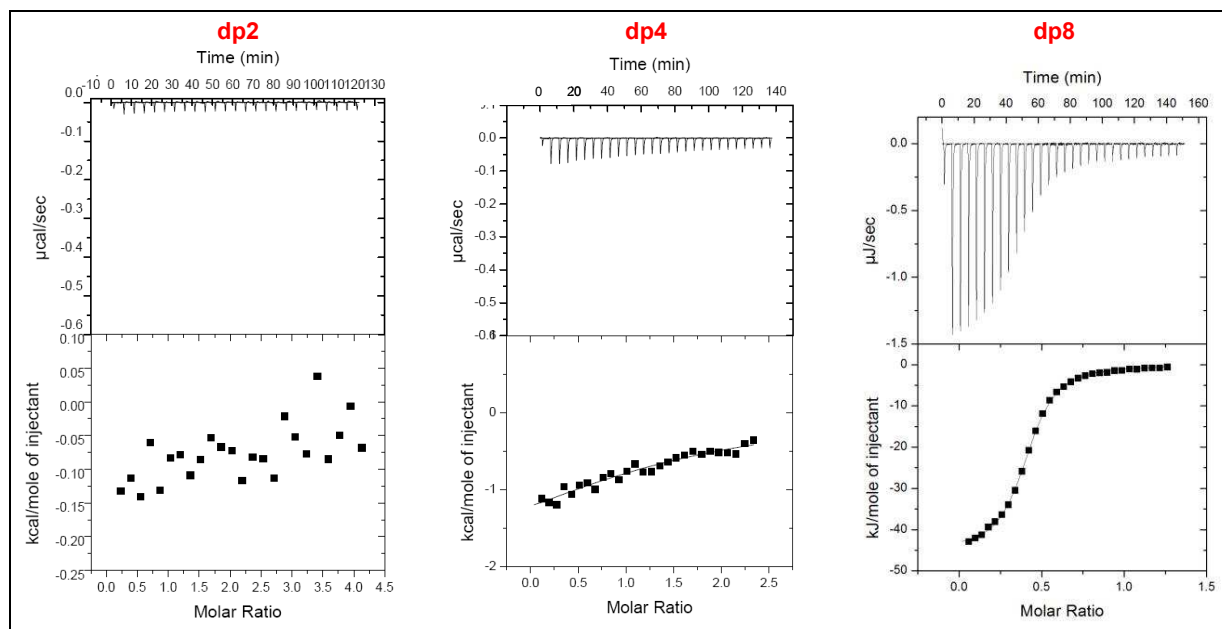


Figure 78 : Taille minimale d'oligosaccharide interagissant avec l'IFN γ à haute affinité.

Courbes de microcalorimétrie avec en haut les thermogrammes obtenus et en bas l'intégration de la chaleur totale libérée en fonction de la titration du ligand. Les résultats sont ajustés par un modèle d'interaction 1:1 et la ligne continue représente le meilleur ajustement possible. De gauche à droite : Titration du dp2 450 μ M, dp4 225 μ M et dp8 112,5 μ M dans de l'IFN γ WT 20 μ M. Une taille minimale de dp8 est nécessaire pour lier l'IFN γ à haute affinité.

I.6. Activité biologique de l'IFN γ

L'importance de la partie C-terminale de l'IFN γ dans l'interaction avec son récepteur ou avec les HS a clairement été démontré par les expériences de SPR. Toutefois, une question reste en suspend : comment cette dernière est alors impliquée dans l'activité de l'IFN γ ? Pour répondre à cette question, l'activité de l'IFN γ WT, des mutants ponctuels, des mutants en série et des mutants de délétion a été déterminée.

I.6.a. Principe du test d'activité

Le test antiviral est historiquement le premier essai cellulaire déterminant l'activité des différents interférons, dont l'IFN γ [393]. Aujourd'hui d'autres tests existent, comme la détermination de l'activité antiproliférative ou de l'activité immunomodulatrice. Cependant la mesure de l'activité antivirale reste la méthode standard de quantification de l'activité de l'IFN γ . C'est pour cette raison que nous avons opté pour cette méthode pour déterminer l'activité de l'IFN γ WT et des différents mutants [393].

Dans les tests antiviraux, l'effet inhibiteur de l'IFN γ sur la réplication virale est quantifié. La façon la plus simple pour déterminer l'effet antiviral de l'IFN γ est la mesure de la capacité de l'IFN γ à protéger des cellules contre l'effet cytopathique d'un virus (figure 79). Pour cela, les cellules sont traitées avec une gamme de concentration d'IFN γ afin d'induire un état de résistance virale avant l'infection avec le virus choisi. Après 24 h ou 48 h en présence de ce virus, l'effet cytopathique est déterminé par la quantification des cellules vivantes à l'aide d'un sel de tetrazolium XTT. Ce sel est réduit par le métabolisme des cellules vivantes en molécule colorée, le formazan. Une simple mesure d'absorbance suffit alors pour évaluer le nombre de cellules vivantes en fonction de la concentration de l'IFN γ [393].

Différentes combinaisons de virus et de cellules sont connues et nous avons choisi d'employer le système des cellules Wish avec le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). L'activité des mutants relatifs par rapport à celle de l'IFN γ WT est déterminée selon cette méthode.

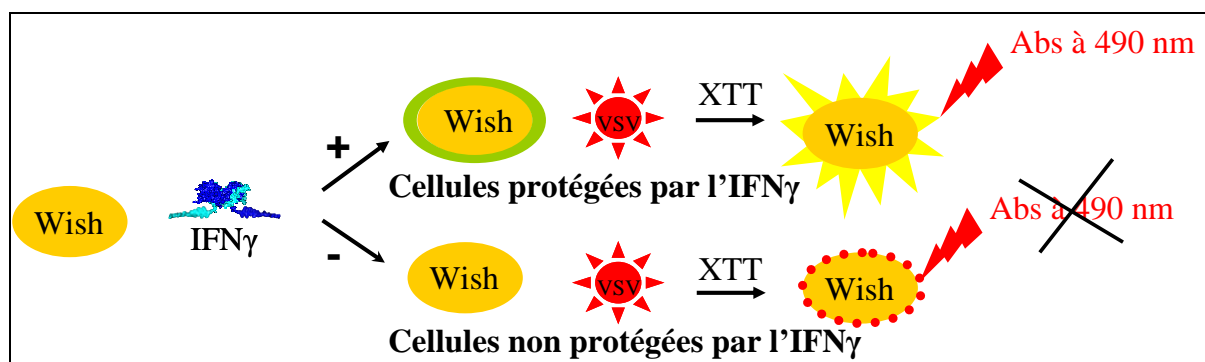


Figure 79 : Schéma du principe du test d'activité antivirale.

Les cellules Wish sont incubées pendant 24 h avec une gamme de concentration d'IFN γ . Les cellules sont ensuite infectées avec le virus VSV pendant 48 h. Une partie des cellules est ainsi protégée contre ce virus grâce aux propriétés antivirales de l'IFN γ . 48 h après l'infection, la viabilité des cellules est mesurée par l'utilisation du test XTT.

I.6.b. Importance du domaine C-terminal de l'IFN γ pour son activité biologique

Afin de déterminer l'activité biologique de chaque mutant, la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) a été calculée pour ceux-ci (figure 80). Cette concentration correspond à la concentration d'IFN γ nécessaire pour protéger la moitié des cellules de la lyse induite par le VSV.

Nous observons tout d'abord, que les mutants IFN γ Δ 124 et IFN γ SD1 sont totalement inactifs, même la plus haute concentration de l'IFN γ n'a pas pu protéger les cellules contre le virus. Ensuite, les mutants dépourvus du domaine D2, le mutant de délétion IFN γ Δ 136 et le mutant en série IFN γ SD2, s'avèrent plus actifs que l'IFN γ WT. Ceci est en accord avec ce qui a été publié auparavant [79]. Enfin, l'importance de chaque résidu basique du domaine C-terminal a été déterminée. L'activité de chaque mutant est légèrement plus élevée que celle de l'IFN γ WT. Tous les mutants n'ont néanmoins pas la même augmentation d'activité. Les résidus 131,137 et 139 sont particulièrement remarquables pour l'augmentation de leur activité. Il n'y a par contre pas de corrélation évidente avec les résultats obtenus par les tests d'interaction avec l'IFN γ R ou avec les HS par SPR.

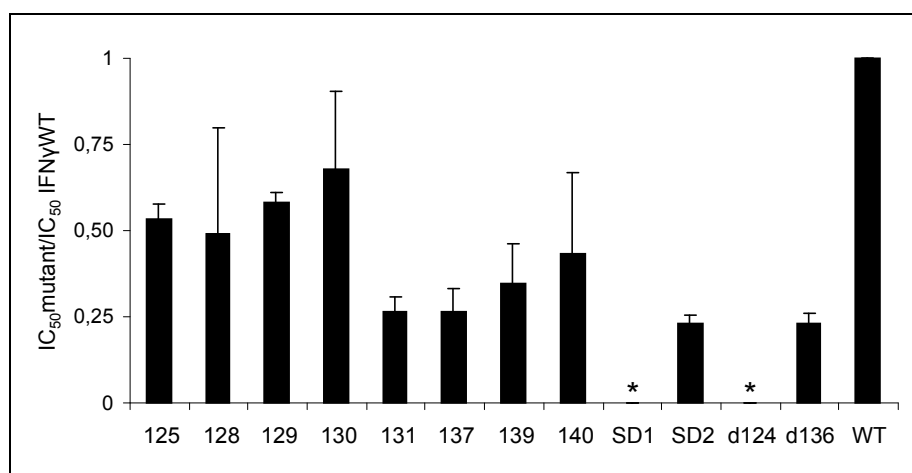


Figure 80 : Activité antivirale des mutants par rapport à celle de l'IFN γ WT.

L'activité antivirale est déterminée comme décrit précédemment. Le rapport de l'activité de chaque mutant par rapport à celui du WT est représenté. (*) Aucune valeur d'IC₅₀ n'a été obtenue pour l'IFN γ SD1 et l'IFN γ Δ 124 puisqu'ils n'ont aucune activité antivirale.

Le fait que les mutants ponctuels, de l'IFN γ Δ 136 et de l'IFN γ SD2 sont actifs est cohérent avec les tests d'interaction par SPR où ils lient l'IFN γ R avec une même affinité que l'IFN γ WT. Leur perte d'affinité pour l'Hp ne semble alors pas altérer leur activité biologique. Cependant, leur affinité pour l'IFN γ R n'explique pas l'augmentation de leur activité. Ce point reste encore mal compris. Une hypothèse est que la diminution de leur affinité pour l'Hp, provoque une meilleure interaction avec l'IFN γ R. Enfin, l'IFN γ SD1, dépourvu des résidus

basiques du domaine D1, est capable de lier l'IFN γ R mais à plus faible affinité que l'IFN γ WT. Cependant, il s'avère inactif. La présence du domaine D1 semble alors essentielle pour l'activité biologique de l'IFN γ .

I.6.c. Influence des HS dans l'activité biologique de l'IFN γ .

Afin de mieux comprendre la contribution des HS dans la signalisation de l'IFN γ , nous avons comparé l'activité antivirale des cellules contenant des HS à la surface avec celles dépourvues de ces derniers. Pour cela, les cellules ont subi un traitement afin de retirer les HS à leur surface cellulaire avant d'être incubées avec l'IFN γ .

- **Élimination des HS sur la surface cellulaire**

Afin d'éliminer les HS à la surface des cellules Wish et de mesurer ensuite l'activité de l'IFN γ en l'absence d'HS, trois méthodes ont été testées. (1) Par l'ajout du β -D-xylopyranoside au milieu de culture. Cette molécule rentre en compétition avec le xylose du tétrasaccharide linker pour l'attachement des HS. Elle interrompt ainsi l'attachement d'HS aux protéoglycanes. (2) Par l'ajout du chlorate de soude au milieu de culture. Le chlorate inhibe la formation du PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) donneur de groupement sulfate au cours de la biosynthèse des HS. Les HS restent ainsi exprimés à la surface cellulaire mais sont dépourvus des groupements sulfates. Comme l'IFN γ interagit avec les HS par les domaines de type NS, cette modification des HS est suffisante pour abolir entièrement l'interaction IFN γ :HS. Nous n'avons pas poursuivi ces deux méthodes puisque nous n'avons pas réussi à détecter une différence d'expression d'HS à la surface cellulaire en utilisant les AcM HepSS1, 10E4 ou JM403. (3) Par l'activité des héparinases qui digèrent les HS à la surface cellulaire (Hep I & III). Ces enzymes sont ajoutées juste avant et pendant l'ajout de l'IFN γ . En revanche, au lieu d'incuber l'IFN γ pendant 24 h celui-ci est uniquement mis en présence des cellules pendant 4 h. Cette diminution du temps d'incubation est nécessaire puisque le traitement avec les héparinases n'est efficace que pendant 4 h, au delà de ce temps, les HS réapparaissent à la surface cellulaire (figure 81). En diminuant le temps d'incubation de l'IFN γ , nous nous assurons que l'effet antiviral observé est bien celui que l'on observerait en l'absence d'HS.

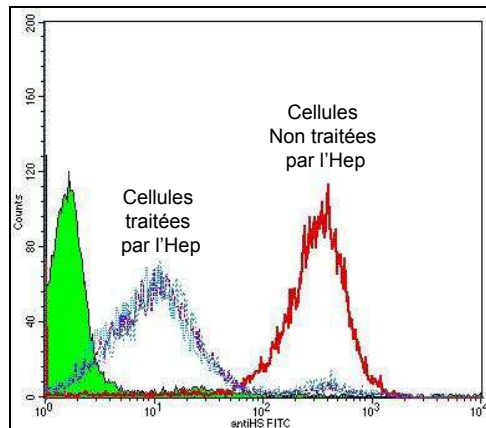


Figure 81 : Analyse de l'expression des HS sur la surface cellulaire après traitement par les Hep I et III.

L'expression des HS est visualisée par la fixation de l'anticorps 10E4 suivie de la fixation de l'anticorps secondaire anti-mouse-FITC, puis analysée par cytométrie en flux. La fixation non spécifique de l'anticorps secondaire est minimale et est illustrée par l'aire verte. Les cellules non traitées avec les héparinases expriment des HS à la surface cellulaire, comme montré par l'augmentation de la fixation de l'anticorps 10E4, illustrée par la courbe rouge. Les cellules traitées avec les Hep I et III perdent les HS, ceci est visible par la perte de la fluorescence par rapport aux cellules non traitées, illustrées sur la courbe rouge. 1 h 30 (courbe turquoise) et 3 h (courbe violette) après le traitement avec les héparinases, les HS ne sont pas encore réapparus à la surface cellulaire, ceci est visible par le fait que la fluorescence n'a pas augmentée par rapport aux cellules analysées juste après le traitement avec les héparinases.

- **Test d'activité antivirale de l'IFN γ en l'absence des HS**

Dans le but d'observer l'influence des HS dans l'activité antivirale de l'IFN γ , les HS sont éliminés de la surface cellulaire par des héparinases, méthode décrite dans le paragraphe précédent. Afin de comparer l'activité antivirale de l'IFN γ en l'absence et en présence des HS, il est essentiel de les analyser dans les mêmes conditions et de façon parallèle.

Lors d'un test préliminaire, nous avons observé une même IC₅₀, correspondant à une même activité antivirale de l'IFN γ WT en l'incubant 4 h ou 24 h. Une diminution du signal d'absorbance est cependant observée pour l'incubation pendant 4 h ce qui n'a pas empêché la détermination de l'IC₅₀. Cette expérience a été répétée plusieurs fois mais nous n'avons jamais pu la reproduire. En effet, pendant les essais comparant l'activité antivirale de l'IFN γ WT, de l'IFN γ Δ 136 et de l'IFN γ SD1 en l'absence et en présence des HS, la baisse de signal de l'absorbance était telle que la détermination de l'IC₅₀ s'est avérée impossible (figure 82). Du fait des lavages supplémentaires après l'incubation avec l'IFN γ pendant 4 h, les cellules Wish peuvent se décoller provoquant une diminution de signal. Des précautions ont été prises pour ne pas décoller les cellules, sans pour autant augmenter le signal. Le décollage des cellules ne semble donc pas la raison de la diminution du signal de l'absorbance. Ceci est vraisemblablement dû à l'incubation de l'IFN γ avec une durée écourtée, limitant sa signalisation et ainsi la production des protéines antivirales. Nous sommes donc face à un problème qui semble difficilement surmontable, car l'incubation pendant 4 h avec l'IFN γ ne

semble pas suffisante pour obtenir un signal exploitable alors que l'augmentation du temps d'incubation est périlleux du fait de la réapparition probable des HS après ce délai.

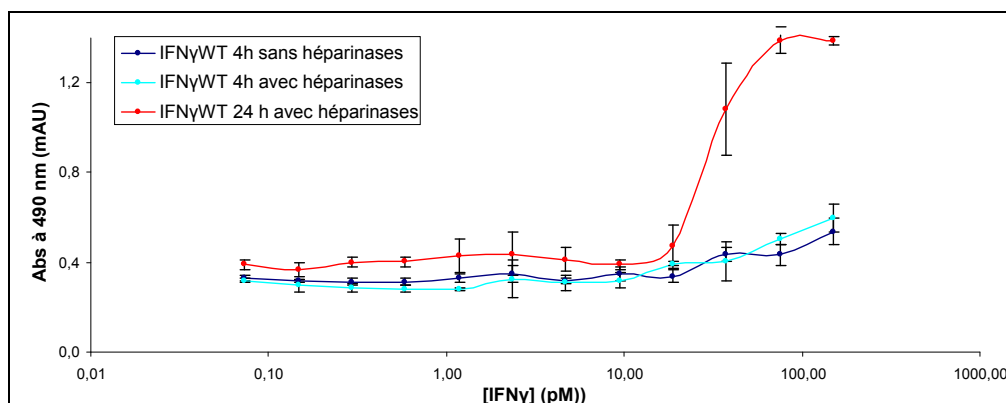


Figure 82 : Baisse du signal d'absorbance lors de l'essai antiviral incubant les cellules uniquement 4 h avec de l'IFN γ WT.

Une forte diminution des signaux d'absorbance est observée lorsque les cellules sont incubées seulement 4 h au lieu de 24 h avec de l'IFN γ dans l'essai antiviral. Cette diminution d'absorbance ne permet pas la détermination de leur IC₅₀. Les signaux d'absorbance mesurés en fonction de la concentration de l'IFN γ WT sont illustrés dans le graphique ci-dessus. L'IFN γ WT incubé pendant 24 h est illustré en rouge, l'IFN γ WT incubé pendant 4 h en présence des HS, sans traitement des héparinases en bleu et enfin l'IFN γ WT incubé pendant 4 h en l'absence des HS du fait du traitement avec des héparinases en turquoise. Des signaux similaires ont été obtenus dans les tests antiviraux avec l'IFN γ SD1 et l'IFN γ Δ 136 incubés pendant 4 h en l'absence ou en présence des HS.

1.7. Conclusion

Une première expérience de perturbation des déplacements chimiques par RMN a confirmé que le site d'interaction de l'IFN γ pour les HS se situe dans le domaine C-terminal de l'IFN γ , impliquant les deux domaines basiques D1 et D2. Grâce à l'obtention d'IFN γ WT et de divers mutants purs et en quantité suffisante, l'importance de ces domaines pour l'IFN γ a pu être déterminée.

En effet, les expériences par SPR démontrent que le domaine D1 est essentiel pour l'interaction de l'IFN γ avec les HS. Il est également impliqué, mais pas essentiel pour l'interaction IFN γ :IFN γ R. En revanche, le domaine D2 est important, mais pas essentiel, pour l'interaction de l'IFN γ avec les HS et il ne semble pas impliqué dans l'interaction IFN γ :IFN γ R. Ainsi, nous avons déterminé que le domaine D2 était spécifique de la liaison d'Hp. Contrairement au domaine D1 qui était impliqué dans la reconnaissance de l'IFN γ R et de l'Hp. Les tests antiviraux, quant à eux, ont confirmés les résultats obtenus par Döbeli *et al.* [79] qui démontrent que la perte du domaine D2 augmente l'activité de l'IFN γ mais que la perte du domaine D1 annihile son activité. Puisque nous n'avons pas réussi à mettre en place un test d'activité antivirale avec des cellules Wish dépourvues d'HS, nous n'avons pas pu corréler les tests d'interaction par SPR avec ceux de l'activité antivirale. Cependant, les

mesures d'activités antivirales en présence d'HS sur les cellules Wish démontrent que ces deux domaines basiques sont importants pour l'activité biologique de l'IFN γ .

Les HS, abondamment présents sur la plupart des cellules (jusqu'à 10^6 molécules par cellule) [227], forment la première ligne de contact à la surface des cellules pour l'IFN γ . L'IFN γ sécrété pourrait alors immédiatement interagir avec ceux-ci et être concentré dans des zones spécifiques, caractérisées par une forte abondance d'HS. Il a effectivement été démontré que l'interaction de l'IFN γ avec les HS entraîne l'absorption rapide de celui-ci dans les tissus [324]. Cette interaction pourrait également localement augmenter la concentration de l'IFN γ puisqu'il est uniquement sécrété dans une gamme de concentration allant de 10^{-9} M à 10^{-12} M [394] ; ceci afin d'accroître l'interaction avec son récepteur (puisque la K_D de cette interaction est plus élevée que la concentration de l'IFN γ sécrété). Cependant un tel mécanisme n'a pas encore été élucidé.

Au vu des résultats des tests d'interaction par SPR de l'interaction IFN γ :HS, nous postulons que le domaine D1 de l'IFN γ interagit de manière plus ferme que le domaine D2 avec les HS. Ce constat est également confirmé par microcalorimétrie où nous observons que les forces d'interactions du domaine D2 avec les HS (par la diminution de l'enthalpie entre l'IFN γ WT et l'FINg Δ 136) sont relativement réduites. Il a été démontré que les HS protègent ce domaine D1 de la dégradation mais pas le domaine D2 [372]. Ceci est en accord avec notre observation que peu de forces d'interactions sont établies entre le domaine D2 et les HS, cette interaction ne semble donc pas protéger le domaine D2 de sa dégradation.

Concernant l'interaction de l'IFN γ avec son récepteur, il a déjà été postulé que le domaine D1 pourrait former un premier contact avec l'IFN γ R [80]. Dans cette étude, il a également été supposé que les domaines D1 et D2 rivalisent l'un par rapport à l'autre pour établir ce premier contact de l'IFN γ avec son récepteur. Nos résultats confirment ceci puisque nous observons une diminution de l'affinité de l'IFN γ pour l'IFN γ R, lorsqu'il est dépourvu d'un de ces deux domaines basiques. De plus, le domaine D1 s'avère plus important que le domaine D2, dans l'interaction avec le récepteur. C'est pourquoi nous supposons que le domaine D1 est effectivement le premier site d'interaction et que l'interaction de ce domaine avec l'IFN γ R mène à la formation d'un complexe IFN γ :IFN γ R stable déclenchant la signalisation. Cette hypothèse pourrait expliquer l'augmentation d'activité retrouvée avec la perte du domaine D2 puisqu'en l'absence de ce domaine, les deux domaines basiques ne rivalisent plus pour interagir avec l'IFN γ R.

Néanmoins, nos résultats ne permettent pas de comprendre comment l'IFN γ initialement lié aux HS peut migrer vers son récepteur puisqu'un même site d'interaction est engagé pour les

deux interactions. En effet, une étude précédente a démontrée que l'IFN γ ne peut pas à la fois lier son récepteur et les HS [80]. Il sera intéressant d'investiguer ce processus de changement de ligand cellulaire des HS vers l'IFN γ R. On peut notamment imaginer des expériences de FRET utilisant de l'IFN γ et de l'IFN γ R attaché à un fluorochrome. En suivant, l'interaction IFN γ :IFN γ R sur des cellules exprimant ou non des HS, nous pourrions potentiellement observer des différences en cinétique d'interaction et en déduire le « mécanisme » de migration de l'IFN γ des HS vers le récepteur.

Nous avons également mis en place un système caractérisant la thermodynamique de l'interaction de l'IFN γ avec des HS par microcalorimétrie, ceci n'a jamais été publié auparavant. Nous avons employé cette méthode pour déterminer la stœchiométrie de l'interaction. Dans le modèle proposé par Lortat-Jacob *et al.* [304], il y a une stœchiométrie de deux dp8 par dimère de l'IFN γ . Cependant, nos expériences mettent partiellement un doute sur ce modèle puisque différentes conformations du complexe IFN γ :dp8 sont observées. Lorsque les dp8 sont titrés dans une solution d'IFN γ , un seul dp8 semble interagir par dimère d'IFN γ , le modèle initialement proposé semble alors invalide. Nous proposons dans ce cas un modèle d'interaction où les extrémités C-terminales de l'IFN γ se referment sur le dp8. Les paramètres thermodynamiques de cette interaction (contribution importante et favorable de l'enthalpie et contribution défavorable de l'entropie) sont compatibles avec un tel modèle d'interaction. De plus, comme cette partie de l'IFN γ est hautement flexible [40], une telle orientation des domaines C-terminaux n'est pas exclue. En revanche, dans un contexte cellulaire, la concentration de l'IFN γ sécrété est minime par rapport à celle des HS présents à la surface cellulaire. Cette situation se rapproche ainsi plus de la titration de l'IFN γ dans une solution contenant du dp8. Dans cette situation, nous supposons la même stœchiométrie que celle présente dans le modèle initialement proposé. En revanche, localement la concentration de l'IFN γ peut être plus élevée et les deux modèles d'interaction pourraient alors coexister.

En comparant, les paramètres thermodynamiques de l'interaction des dp8 avec l'IFN γ WT avec l'IFN γ Δ 136, nous avons cherché à extraire les contributions respectives des domaines D1 et D2. Néanmoins, de nombreux facteurs thermodynamiques (entropie, effet polyélectrolyte, rigidication,...) semblent intervenir dans cette interaction en plus de la coexistence de deux conformations du complexe IFN γ :dp8. C'est pourquoi les différentes contributions thermodynamiques de ces domaines restent difficiles à identifier au niveau des domaines individuels. Cependant, dans l'ITC classique, où seul un complexe avec une stœchiométrie d'un dp8 par dimère d'IFN γ est présent, l'absence du domaine D2 modifie fortement la thermodynamique de l'interaction. En effet, en présence du domaine D2,

l'interaction des dp8 avec l'IFN γ est menée par la contribution enthalpique. En effet, cette interaction est favorable ($\Delta G < 0$) grâce à l'enthalpie de l'interaction, indiquant que des contacts affins entre l'IFN γ et les dp8 sont établis. Cependant, l'entropie de l'interaction est défavorable, probablement par la rigidification des partenaires lors de l'interaction qui n'est pas entièrement contrebalancer par l'effet polyélectrolyte (libération des contre-ions associés) [392]. En revanche, en l'absence de ce domaine, moins de contacts dp8:IFN γ sont présents puisque la contribution enthalpique a diminuée par rapport à celui de l'IFN γ WT. La contribution entropique de la réaction devient favorable, probablement, parce que la flexibilité des partenaires de l'interaction est moins restreinte. Ce système a été utilisé pour confirmer que la taille minimale d'oligosaccharide nécessaire pour interagir avec l'IFN γ était d'un dp8 [304, 327]. Nous avons également confirmé que le domaine D1 et D2 du domaine C-terminal de l'IFN γ sont importants, voir essentiels, pour l'interaction avec les HS.

Une vision plus détaillée de cette interaction pourrait être obtenue via des titrations à différentes températures ou à différentes concentration de sel. Effectivement, de cette manière, nous pourrions déterminer si des interactions hydrophobes ont lieu et quantifier les forces ioniques et non ioniques. La contribution de forces non-ioniques peut indiquer que des interactions spécifiques sont à la base de l'interaction de l'IFN γ avec le dp8 suggérant l'existence d'une séquence d'HS particulière liant l'IFN γ [386, 395].

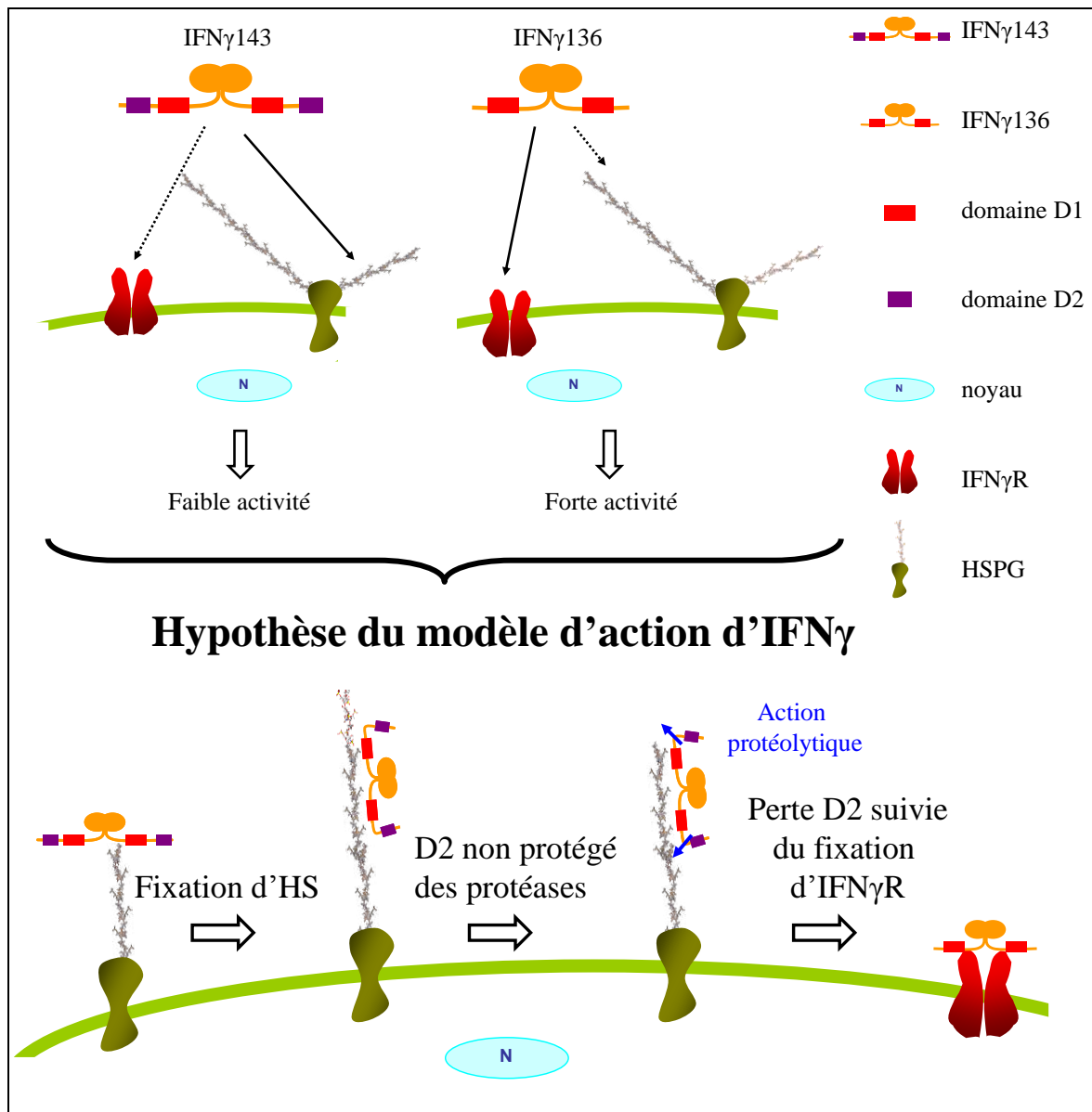


Figure 83 : Modèle hypothétique d'action de l'IFN γ .

Nos travaux ont permis de déterminer que l'IFN γ 143 (WT) interagirait rapidement avec les HS engageant le domaine D1 et D2 dans l'association du complexe IFN γ :HS. Ce domaine D1 est également impliqué dans l'interaction de l'IFN γ avec son récepteur. L'affinité de l'IFN γ 143 pour son récepteur ($K_D = 0,59$ nM) étant du même ordre de grandeur que celle déterminée pour l'HS ($K_D = 1,41$ nM) nous proposons que l'IFN γ 143 interagisse majoritairement avec les HS à la surface des cellules qui expriment généralement des quantités d'HS bien supérieures à celle de l'IFN γ R. En revanche, l'IFN γ 136, dépourvu du domaine D2, interagit avec les HS avec une affinité beaucoup plus basse ($K_D = 114,3$ nM) qu'avec l'IFN γ R ($K_D = 0,75$ nM). De ce fait, nous proposons que cet IFN γ interagisse majoritairement avec l'IFN γ R présent sur la surface cellulaire et non avec les HS.

A partir de ces conclusions nous proposons un modèle hypothétique de régulation de l'activité de l'IFN γ par les HS : l'IFN γ sécrété dans le milieu extracellulaire interagit très rapidement avec les HS présents sur la surface cellulaire. Étant donné que nous avons démontré que le domaine D1 et D2 sont impliqués dans l'association du complexe mais que seul le domaine D1 interagit de manière spécifique avec les HS, nous supposons que le domaine D2 n'est pas protégé contre l'action de protéases [277]. Ce domaine peut alors être protéolysé et nous suggérons que la perte de ce domaine provoque la « migration » de l'IFN γ des HS vers l'IFN γ R par un mécanisme encore inconnu à ce jour.

Recherche du site d'interaction de l'IFN γ pour les HS

Ce chapitre décrit le travail que nous avons effectué pour identifier à partir d'une banque d'octasaccharides dérivés d'HS, les déterminants oligosaccharidiques responsables de la liaison à l'IFN γ .

Par ailleurs, pour analyser l'importance de la densité de sulfate dans les processus d'interaction protéine-GAG, nos collaborateurs ont développé des puces contenant différents mélanges de deux disaccharides, l'un non-sulfaté et le second amplement sulfaté, mimant ainsi les différents domaines (NS/NA) des HS.

L'interaction, avec cette puce, de différentes protéines, dont l'IFN γ produit au cours de mon travail de thèse, a permis de mettre en évidence que chaque protéine nécessitait un taux de sulfate particulier pour son interaction. Ce travail a été publié (voir annexe p 244).

Hou Y., Genua M., Tada Batista D., Calemczuk R., Buhot A., Fornarelli P., Koubachi J., Bonnaffé D., **Saesen E.**, Laguri C., Lortat-Jacob H. and Livache T. Continuous

Evolution Profiles for Electronic Tongue Based Analysis.

Angew Chem Int Ed Engl. 51(41), 10394-10398 (2012)

II. Recherche du site d'interaction de l'IFN γ pour les HS

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons détaillé les zones de contact sur l'IFN γ pour l'interaction avec les HS ainsi que la thermodynamique de l'interaction. Dans le chapitre qui suit, nous allons examiner le site d'interaction des HS pour l'IFN γ .

Comme détaillé dans l'introduction de très nombreux types d'interactions protéine:HS ont été décrits [186, 188, 219, 312]. Dans le cas de l'IFN γ , un modèle d'interaction a déjà été proposé dans lequel deux dp8 de type NS d'HS interagissent avec les domaines C-terminaux de l'IFN γ . Ces dp8 sont espacés par un domaine interne de type NA qui n'interagit pas directement avec la cytokine [304, 320]. Cependant, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'importance des « séquences » oligosaccharidiques présentes dans les domaines NS pour l'interaction avec l'IFN γ .

Dans ce contexte, nous avons souhaité apporter des informations sur ces « séquences » de dp8 liant l'IFN γ . Pour ce faire différentes stratégies sont possibles. Cependant, il est important de noter qu'aucune preuve n'existe pour affirmer qu'un oligosaccharide spécifique soit à la base de la haute affinité avec l'IFN γ comme cela a été montré pour l'interaction de l'ATIII avec un pentasaccharide dérivé d'Hp [213, 296-297]. Nous faisons néanmoins l'hypothèse que, même en l'absence d'une telle « séquence » spécifique, il est possible que certains groupements sulfates soient plus importants que d'autres pour l'interaction avec l'IFN γ .

Une première méthode d'analyse des dp8 est la séparation par « fishing » des dp8 liant l'IFN γ à forte affinité à partir d'un mélange. L'avantage de cette méthode est que la préparation des dp8 est relativement facile comprenant une simple digestion des HS suivie de leur séparation selon leur taille. En revanche, en aval tout un travail sur l'identification des séquences des dp8 retenus par l'IFN γ doit avoir lieu, afin de retrouver des motifs essentiels présents dans ces derniers pour lier la protéine à haute affinité. Les premiers essais de ce genre de séparation ont été fait par l'incubation de l'IFN γ avec un mélange de dp8 suivi d'une séparation de la fraction des dp8 liée de celle non liée par membrane de nitrocellulose par la technique de filter binding assay (FBA) détaillée dans le paragraphe II.3 [306] ou alors par centrifugation sur membrane dont le seuil de coupure est de 30 kDa, laissant passer les dp8 libres et retenant ceux liés à l'IFN γ . L'analyse des fractions liées et non liées, par colonne échangeuse d'anions

Propac PA1 en HPLC, n'a pas démontré de fixation spécifique. En effet, environ dix pourcent du dp8 total a été fixé par l'IFN γ mais aucun dp8 particulier n'a semblé enrichi dans la fraction liée (résultats non présentés).

Nous avons ensuite tenté de fractionner les dp8 à l'aide d'une colonne d'affinité contenant le peptide C-terminal de l'IFN γ , en utilisant un gradient de sel pour éluier les dp8 liés à la colonne d'affinité [345-346]. Une fixation « globale » analogue à celle observée lors de la séparation des dp8 par membrane de nitrocellulose ou par centrifugation a été retrouvée. Nous n'avons probablement pas réussi à séparer les différentes espèces pour les trois raisons suivantes : (1) La différence d'affinité pour l'IFN γ entre les différentes espèces de dp8 est trop faible pour les séparer par « fishing ». (2) Des espèces éventuellement très affines pour l'IFN γ ne sont pas présentes, ou en trop faible quantité dans l'échantillon initial. (3) Utiliser des dp8 (plutôt qu'une structure contenant deux dp8 reliés par un domaine interne) réduit l'affinité de façon trop importante pour pouvoir isoler une fraction particulière.

Une deuxième stratégie a donc été d'analyser des dp8 purifiés pour leur capacité à lier l'IFN γ . Avant de pouvoir déterminer l'affinité de différents dp8 pour l'IFN γ , une banque de différents dp8 a dû être préparée.

II.1. Préparation d'une banque d'oligosaccharides

Aujourd'hui trois stratégies différentes de préparation d'une telle banque d'oligosaccharides sont accessibles. Tout d'abord, la méthode classiquement utilisée est la purification à partir d'une source naturelle d'HS [396]. Elle est facile à mettre en place et nécessite peu de matériel spécifique. De plus, toutes les séquences naturellement présentes dans les HS sont évidemment représentées dans cette banque. Ensuite, une banque d'oligosaccharides peut alternativement être obtenue par des méthodes chimio-enzymatiques [397-398]. Elle consiste en la modification enzymatique et chimique d'une chaîne d'HS, non sulfatée et non épimérisée, obtenue par la purification des héparosans d'*E.coli* K5. La purification des différentes séquences obtenues permet la préparation d'une banque d'oligosaccharides diversement modifiés. L'avantage de cette méthode est que les séquences d'HS peu abondantes dans la nature peuvent ainsi être enrichies. Cette méthode, qui repose sur l'utilisation de nombreuses enzymes de biosynthèse (non toutes disponibles au laboratoire), n'a pas été retenue dans le contexte de notre étude. Enfin, une troisième stratégie consiste en l'élaboration de différents oligosaccharides par synthèse chimique [287, 321, 399]. Ceci est extrêmement laborieux et souvent caractérisé par des rendements très faibles. Cependant,

cette méthode a l'avantage d'aboutir à des espèces d'oligosaccharides complètement purs et de séquences connues. Puisque nous avons souhaité analyser l'affinité des différents dp8 avec l'IFN γ , 48⁴ soit plus de 5 millions de séquences différentes de dp8 sont théoriquement possibles. La synthèse d'un tel nombre de dp8 n'est pas envisageable.

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi de préparer une banque de dp8 à partir d'une source naturelle. La purification d'une telle banque a lieu en trois étapes : la dépolymérisation enzymatique des HS suivie d'une filtration sur gel séparant les oligosaccharides obtenus en fonction de leur taille avant de les séparer, selon leur charge, par une chromatographie échangeuse d'anions.

II.1.a. Préparation d'une banque d'oligosaccharides de taille différente

La banque de dp8 que nous voulions préparer est issue des domaines NS des HS car le site d'interaction de l'IFN γ sur les HS correspond à ces domaines [304]. Pour cela, de l'HS issu de muqueuse intestinale de porc est dépolymérisé par l'Héparinase (Hep) III. Cette enzyme fragmente, par un mécanisme de β -élimination, les HS au niveau de la liaison 1-4 entre les glucosamines N-acétylés et les acides glucuroniques, caractérisés par un faible taux d'O-sulfatation (figure 84). Les domaines NA sont ainsi presque entièrement fragmentés en disaccharides contrairement aux domaines NS qui sont maintenus entiers. La réaction est suivie par mesure de l'absorbance à 232 nm, longueur d'onde à laquelle une liaison insaturée, générée au niveau des GlcA par l'enzyme, absorbe.

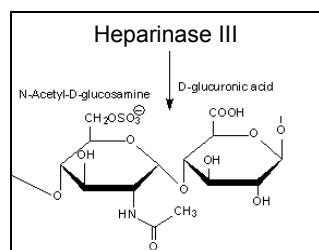


Figure 84 : Substrat de l'héparinase III.

L'héparinase III fragmente les HS par la β -élimination des acides glucuroniques liés à une glucosamine N-acétylée dans des régions de faible O-sulfatation. La plupart de ces structures sont présentes dans les domaines NA des HS.

Des oligosaccharides de tailles différentes, issus des domaines NS des HS, sont alors obtenus. Ces différents fragments sont ensuite séparés par leur taille à l'aide d'une filtration sur gel sur colonne Biogel P10. Cette colonne est composée d'un gel de polyacrylamide, qui est une résine hydrophile non chargée permettant une bonne séparation des oligosaccharides. Avec la

colonne utilisée (1500 mm x 44 mm), des oligosaccharides ayant une taille maximale de 4,2 kDa, correspondant à un tétradécasaccharide (dp14) ont pu être purifiés (figure 85).

Afin d'obtenir des quantités d'oligosaccharides suffisantes, 10 g d'HS dépolymérisés sont séparés par filtration sur gel. Cependant, seul 1 g d'HS peut être purifié par filtration sur gel. C'est pourquoi dix séparations sur gel de 1 g d'HS dépolymérisé ont été effectuées. Chaque filtration sur gel durait 48 h pendant lesquels l'éluant était récolté par fraction de 15 min (correspondant à 15 mL). L'élution des différentes fractions n'a pas pu être suivie en ligne. C'est pourquoi l'absorbance, à une longueur d'onde de 232 nm, est mesurée pour chaque fraction après la fin de la filtration sur gel. Les différents profils d'élution sont parfaitement identiques à celui représenté sur la figure 85. Pour chaque chromatogramme, les fractions correspondant aux oligosaccharides dp4 à dp14 ont été rassemblées, dialysées pendant 48 h avant d'être lyophilisées. Les dix préparations par filtration sur gel de 1 g nous ont permis d'obtenir entre 140 mg et 350 mg de chaque oligosaccharide.

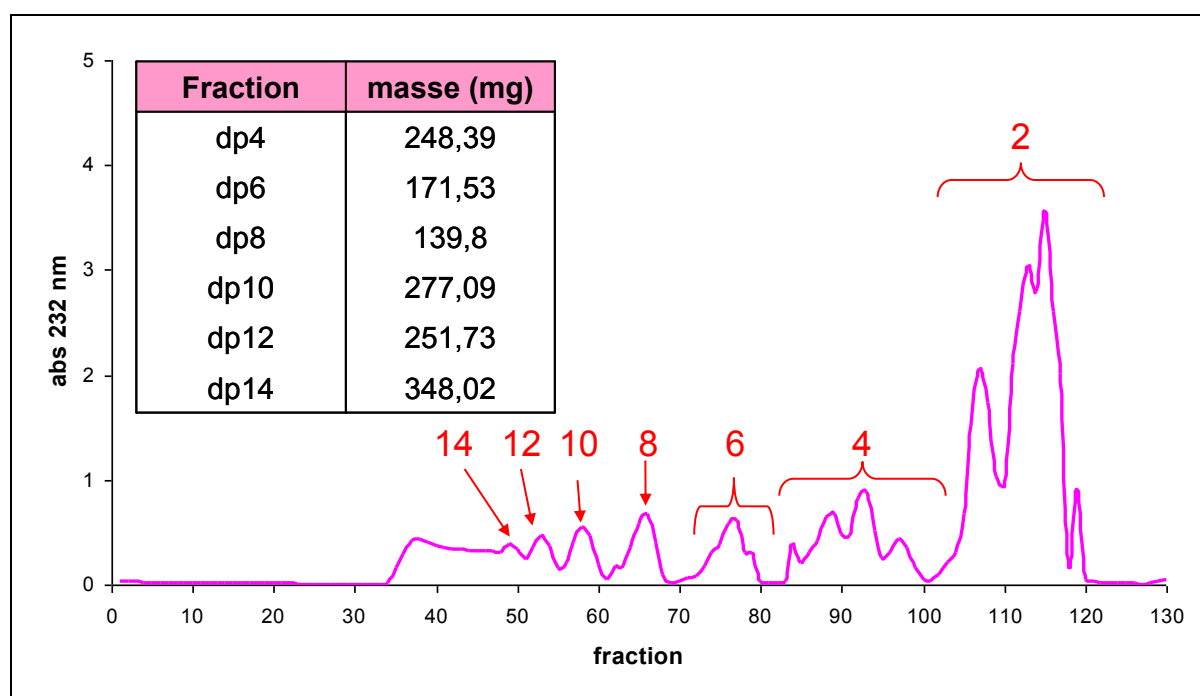


Figure 85 : Séparation des oligosaccharides par leur taille avec une filtration sur gel.

Les différents oligosaccharides, issus de la digestion de 10 g d'HS par l'héparinase III, sont séparés par leur taille à l'aide d'une filtration sur gel Biogel P10 (1500 mm x 44 mm). Le profil d'élution illustré ci-dessus correspond à la séparation en taille de 1 g d'HS digéré, les différentes préparations sont parfaitement identiques à celle représentée. Chaque fraction correspond à 15 min d'élution à 1 mL/min. Dix chromatogrammes de 1 g chaque ont dû être effectués pour obtenir les quantités d'oligosaccharides (dp4 à dp14) indiquées dans la figure.

II.1.b. Préparation d'une banque d'octasaccharides

Puisque nous souhaitons préparer une banque de dp8 dont chaque élément aura une charge globale définie, la fraction de dp8 obtenue par filtration sur gel est séparée par une colonne échangeuse d'anions, Propac PA1. Une bonne séparation des dp8 est uniquement possible en adaptant la quantité de dp8 injectée à la capacité de chargement de la colonne Propac PA1. Ainsi, seul 7,5 mg de dp8 ont été injecté sur la colonne échangeuse d'anions. Pour chaque chromatogramme, d'une durée de 2 h, l'éluant est récolté en fraction de 30 s (correspondant à 2,5 mL) et l'élution est suivie en ligne par l'absorbance à une longueur d'onde de 232 nm. Dans un premier profil d'élution, illustré sur la figure 86, nous avons identifié vingt-trois dp8 qui seront, pour des raisons de simplicité, dans la suite du manuscrit annoté comme correspondant aux fractions 8.01 à 8.23. Au vu des quantités de dp8 requises pour les tests d'interactions, nous avons répété ce chromatogramme six fois. Chaque élution était parfaitement identique à celle représentée sur la figure 86. Pour chaque chromatogramme, les 23 fractions de dp8 ont été rassemblées, dialysées pendant 48 h avant d'être lyophilisées. Entre 15 µg et 39 µg de chaque fraction est obtenue à partir de 45 mg (6 x 7,5 mg) de dp8 (tableau 9).

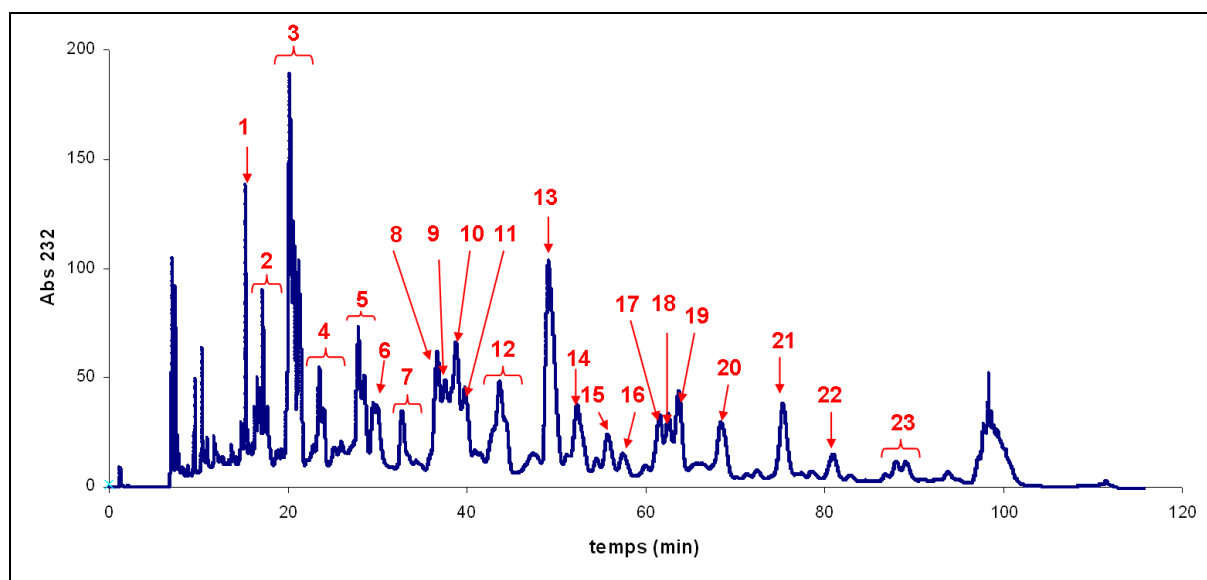


Figure 86 : Séparation des dp8 en fonction de leur charge sur une colonne échangeuse d'anions Propac PA1.

Sept et demi mg de dp8 issus de la filtration sur gel ont été dialysés et lyophilisés, avant d'être injectés sur la colonne Propac PA1 (9 mm x 250 mm). Les différentes fractions sont éluées par un gradient de sel allant de 0 à 1 M. 23 fractions différentes sont récoltées. Afin d'obtenir une fraction de dp8 la plus pure possible, seules les fractions correspondant à la pointe de chaque pic d'élution sont récupérées.

Fraction	concentration (mM)	quantité (nmole)	quantité (µg)
8.01	1,3	94	188
8.02	1,2	297	595
8.03	2,2	879	1759
8.04	1,7	332	665
8.05	1,2	357	714
8.06	0,9	246	492
8.07	1,0	179	357
8.08	1,4	332	664
8.09	1,4	231	461
8.10	1,7	340	680
8.11	1,7	256	512
8.12	1,0	356	712
8.13	2,0	764	1528
8.14	1,5	407	815
8.15	0,9	213	426
8.16	0,9	101	201
8.17	2,0	263	527
8.18	2,1	377	755
8.19	1,2	240	479
8.20	0,9	268	536
8.21	0,8	186	373
8.22	0,9	195	390
8.23	0,8	274	548

Tableau 9 : Tableau récapitulatif de la quantité des différents dp8 obtenus.

Quarante-cinq mg de dp8 issus de la filtration sur gel sont séparés par la colonne échangeuse d'anions Propac PA1. Les différentes préparations par colonne échangeuse d'anions sont extrêmement comparables et les fractions de l'élution des différentes sous-espèces de dp8 (8.01-8.23) sont rassemblées puis dialysées et lyophilisées.

II.2. Analyse de la banque de dp8 préparée par MALDI-TOF-MS.

Vingt trois fractions différentes de dp8 ont été isolées à partir d'un mélange de dp8 issu d'HS dépolymérisé par Hep III. Pour certaines d'entre elles, seule une séquence semble présente dans la fraction purifiée au vu du profil d'élution de la colonne échangeuse d'anions. Pour d'autres, la présence de multiples séquences semble en revanche évidente. Nous avons

souhaité entreprendre une première analyse structurale par spectrométrie de masse (MS) de ces 23 fractions de dp8 afin de se rendre compte de leur degré de pureté et de leurs caractéristiques structurales.

La MS est depuis une décennie reconnue comme étant une méthode extrêmement efficace et sensible pour l'analyse structurale des GAG [400]. Ceci essentiellement grâce à l'adaptation de méthodes d'ionisation dites douces, telles que la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'électroébulisisation (ESI), à l'analyse des carbohydrates. Bien que l'ESI soit plus sensible que la MALDI, nous avons utilisé cette dernière méthode pour analyser nos fractions de dp8 puisque les spectres obtenus par MALDI sont plus faciles à interpréter que ceux obtenus par ESI [331, 400]. En effet, du fait de changements de cations multiples, le spectre obtenu par ESI-MS est très complexe. De ce fait, les masses moléculaires des composants de l'échantillon sont difficiles à déterminer, surtout si de multiples séquences d'oligosaccharides avec des masses moléculaires similaires sont présentes dans l'échantillon (ce qui est probablement le cas dans nos fractions de dp8). Du fait d'une efficacité d'ionisation médiocre et d'une instabilité des groupements sulfates, la technique MALDI était néanmoins, jusqu'il y a quelques années, peu utilisée pour l'analyse des GAG [334, 336, 401-402]. Nos collaborateurs, du laboratoire analyse et modélisation pour la biologie et l'environnement de l'université d'Évry-val-d'Essonne, ont mis au point une nouvelle matrice HABA-TMG₂ (détaillée dans le paragraphe suivant) [331] permettant l'analyse des HS. Nos différentes fractions de dp8 ainsi que le mélange de dp8 non fractionné seront analysés par la technique MALDI-TOF mise au point par nos collaborateurs [331].

II.2.a. Analyse du mélange des dp8 par MALDI-TOF-MS

Les dp8 non fractionnés ont tout d'abord été analysés par MALDI-TOF-MS employant une matrice HABA-TMG₂ spécifiquement mis au point par nos collaborateur afin d'augmenter le signal et de diminuer la perte des groupements sulfates lors de l'ionisation d'oligosaccharides de type HS. Nous observons un grand nombre d'espèces différentes ayant entre 3 et 8 groupements sulfates par dp8 et 1 ou 2 groupements acétyles (figure 87). Des espèces avec moins de trois groupements sulfates par dp8 sont également observées mais proviennent vraisemblablement d'espèces plus sulfatées qui auraient été partiellement désulfatées lors de leur ionisation. Ce processus sera détaillé dans le paragraphe suivant. La présence d'une liaison insaturée ainsi que la présence d'un groupement acétyle est due à la fragmentation d'HS par l'Hep III. Il faut noter que même si les dp8 ont une même masse, c'est-à-dire un

même nombre de groupements sulfates et acétyles, la position de ces modifications et donc leur « séquence » peut être variable. Ce spectre est très complexe, probablement du fait d'une multitude de dp8 différents et d'un certain degré de désulfatation de ces dp8. C'est pour cette raison que seuls les pics majeurs ont été attribués. De plus, des masses correspondant aux dp8 saturés sont observées, toutefois en très faible intensité. Ces dp8 ne devraient normalement pas être présents puisque l'Hep III génère une liaison insaturée dans chaque dp8 par son activité éliminase. Cependant, il a été démontré que l'Hep III a parfois une activité hydrolase en plus de son activité éliminase. C'est cette activité enzymatique qui peut saturer la liaison insaturée par l'ajout d'une molécule d'eau, cette activité est néanmoins rare [403].

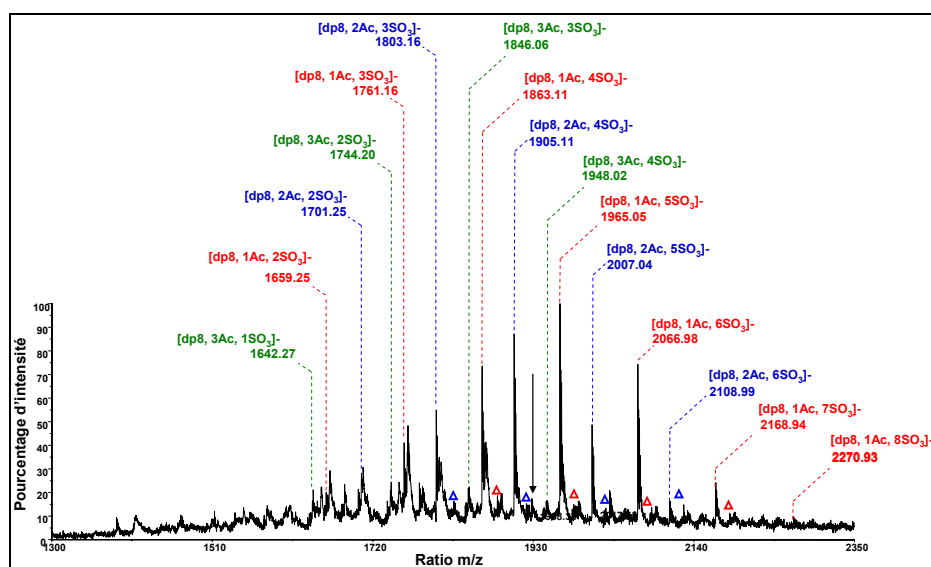


Figure 87 : Spectre MALDI-TOF-MS du mélange des dp8.

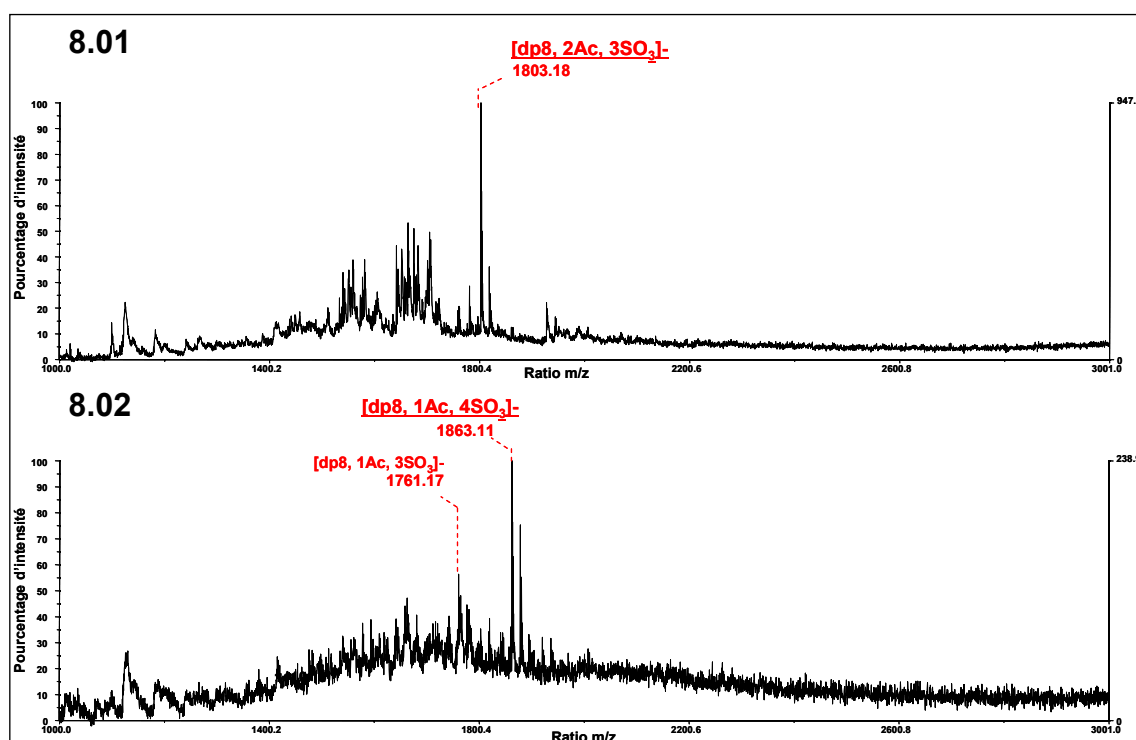
Spectre de dp8 non fractionnés analysés par MALDI-TOF négative en mode réflecteur, enregistré après dépôt de 0,6 µL de dp8 à 10 mg/mL (correspondant à environ 2.5 nmoles) mélangés avec 0.6 µL de matrice HABA/TGM₂. Les ions les plus présents dans la solution sont annotés. Les masses correspondent à des adduits de sodium en mode négatif. Les Δ représentent les dp8 saturés.

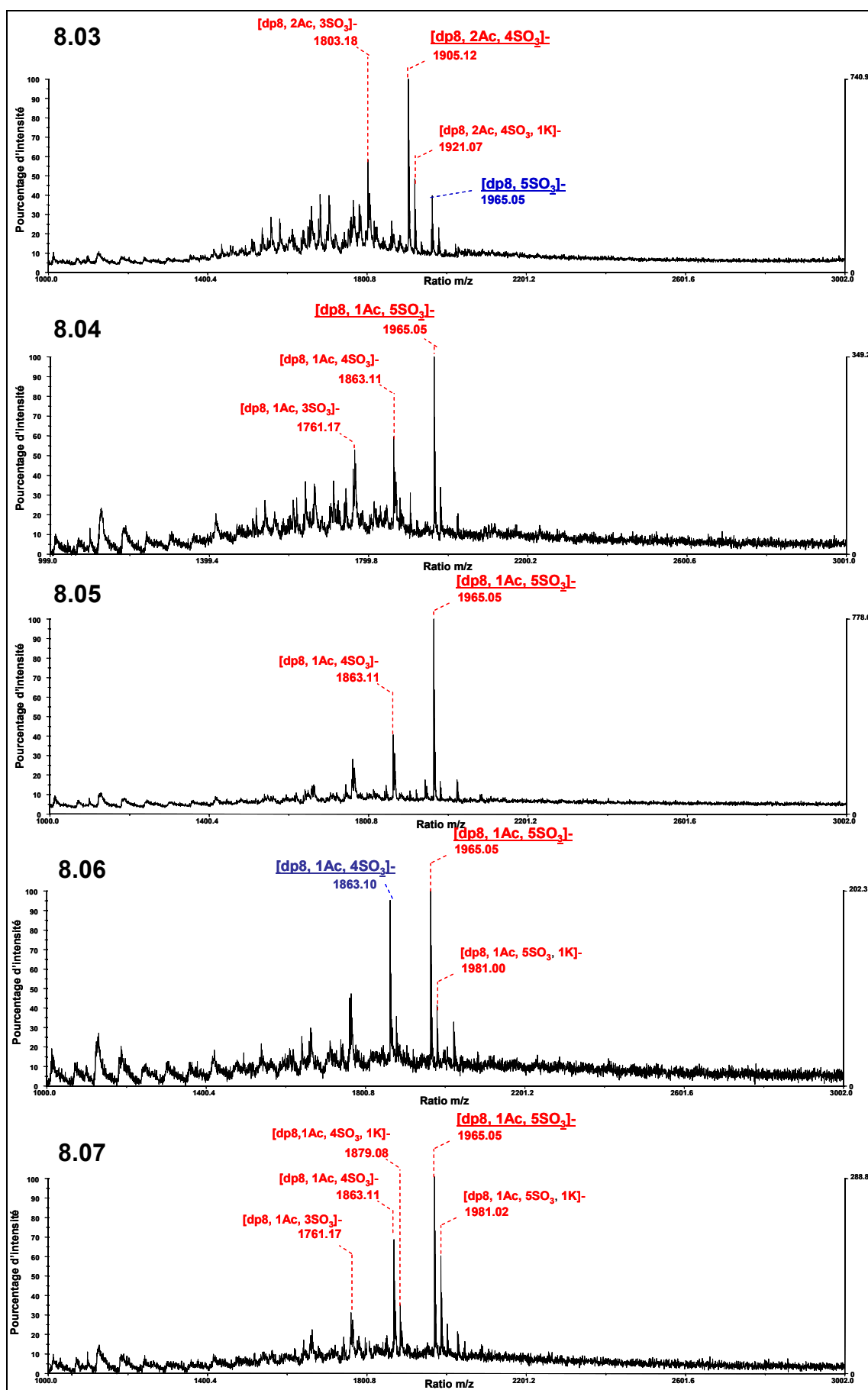
II.2.b. Analyse des différentes fractions de dp8 par MALDI-TOF-MS

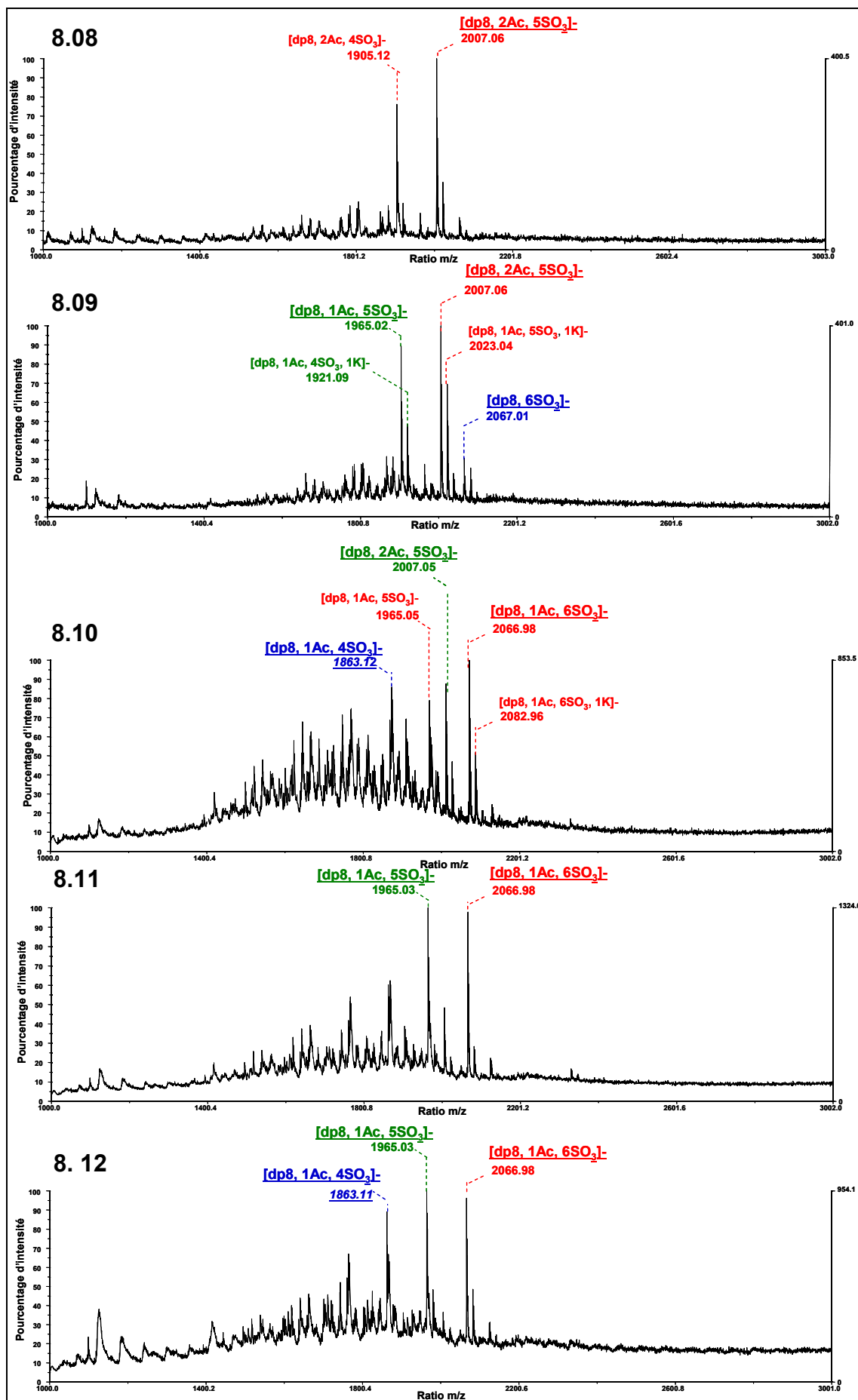
L'analyse des différentes fractions confirme, tout d'abord, la présence d'un ou de deux groupements acétyles et de 3 à 8 groupements sulfates par dp8, comme observé dans le mélange de dp8 non fractionné. Les spectres de dp8 isolés sont moins complexes et ainsi mieux résolus. Une certaine complexité du spectre est malgré tout présente du fait de l'échange de cations et de la perte de quelques groupements sulfates. En effet, même en concentration minimale de potassium un échange de cations (sodium en potassium) est possible du fait de la haute affinité des groupements sulfates pour le potassium. Ceci est notamment observé pour la fraction 8.07 (tableau 10), où le dp8 [dp8, 1Ac, 5SO₃]⁻ (MM = 1965,05 Da) a subi un échange de cations, donnant lieu à l'apparition d'une masse correspondant au dp8

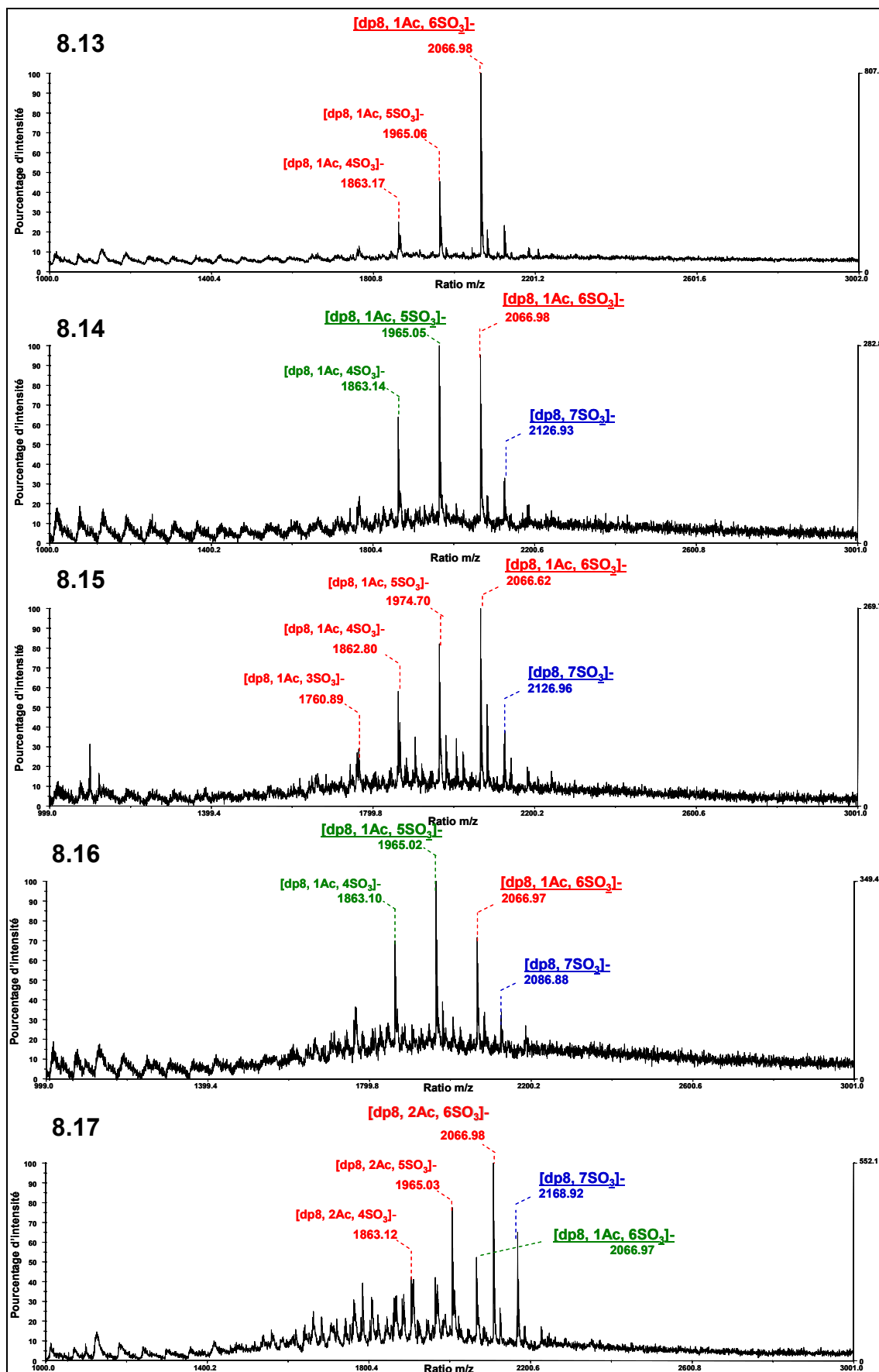
[dp8, 1Ac, 5SO₃, 1K]⁻ (MM = 1981,02Da). De plus, dans la plupart des fractions, des masses correspondant aux dp8 avec un ou deux groupements sulfates de moins que l'espèce majoritaire est remarquée. Il peut s'agir d'un autre dp8 présent dans la fraction initiale ou de l'espèce majoritaire désulfatée. En effet, l'analyse d'une dodécasaccharide de synthèse a démontré la fragilité des groupements sulfates lors de l'ionisation des oligosaccharide [331]. Cependant, le profil de masse obtenu, suite à la désulfatation progressive d'un seul oligosaccharide, a un profil de masse typique contenant des pics avec des tailles décroissantes correspondant à la désulfatation graduelle de cet oligosaccharide [331]. Ainsi, selon le profil de masse obtenu, on peut suggérer qu'il s'agit d'un dp8 présent dans la fraction ou d'un dp8 désulfaté.

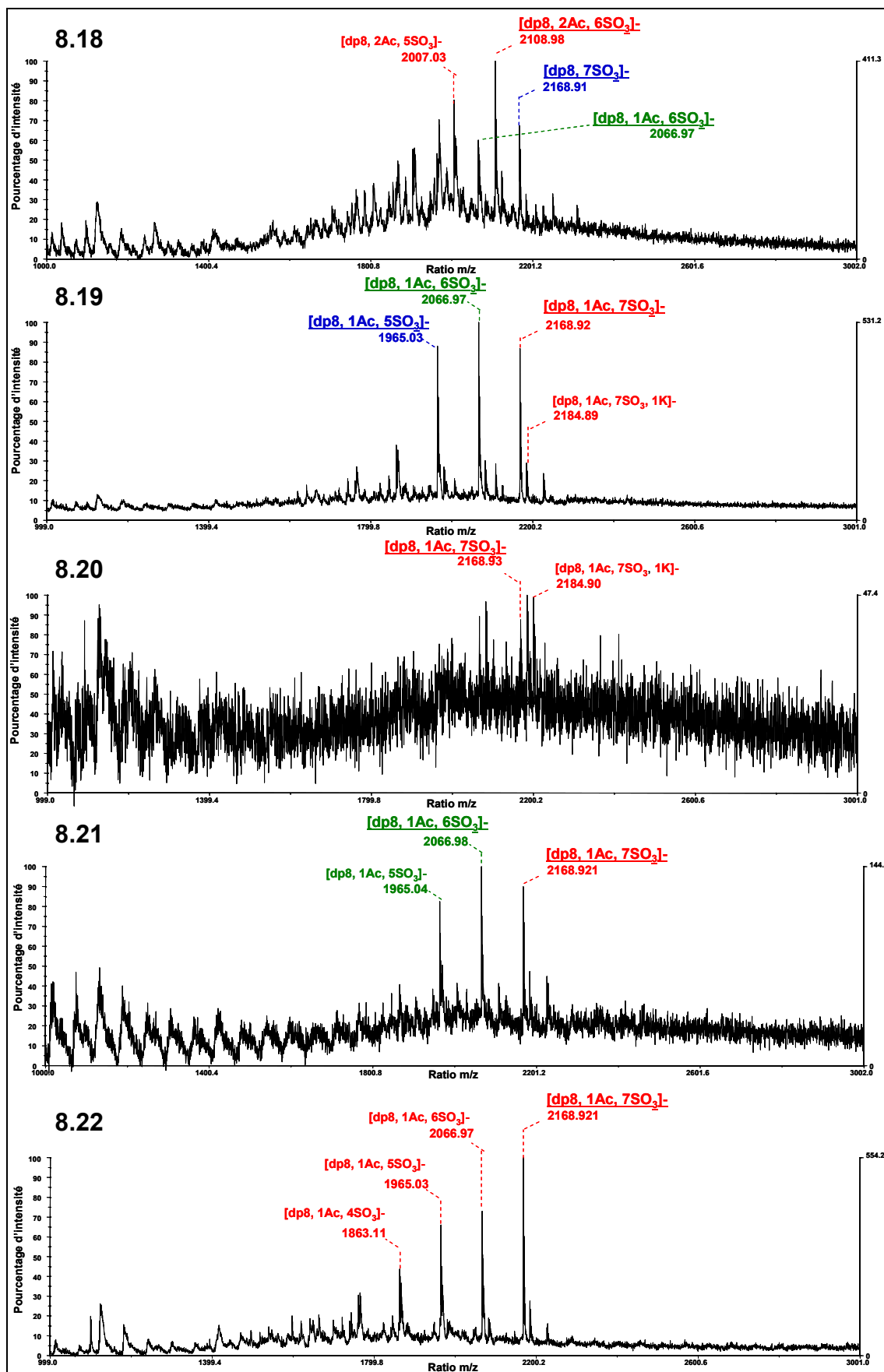
Pour la fraction 8.22 (tableau 10), le profil de masses obtenu, des pics avec des tailles décroissantes correspondant successivement à la perte d'un groupement sulfate, est typique d'un profil de désulfatation d'un dp8. L'espèce majoritaire [dp8, 1Ac, 7SO₃]⁻ (MM = 2168,92 Da) est sûrement la seule espèce présente dans la fraction 8.22. Les autres masses détectées peuvent correspondre à des formes désulfatées de ce dp8. Cependant, pour la fraction 8.16 (tableau 10), la taille du pic correspondant à l'espèce [dp8, 1Ac, 5SO₃]⁻ (MM = 1965,02 Da) est plus grande à celle correspondant à l'espèce [dp8, 1Ac, 6SO₃]⁻ (MM = 2066,97 Da). De ce fait, nous supposons que ces deux espèces sont présentes dans la fraction 8.16 initiale. Néanmoins, une partie de l'espèce [dp8, 1Ac, 5SO₃]⁻ observée correspond sûrement à l'espèce [dp8, 1Ac, 6SO₃]⁻ qui a été désulfatée lors de son ionisation.











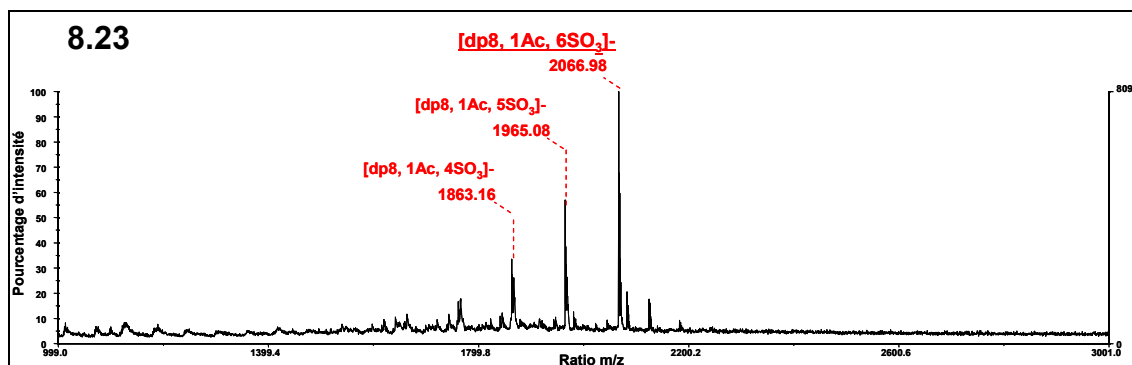


Figure 88 : Spectre MALDI-TOF-MS des différentes fractions de dp8.

Spectres de masses par MALDI-TOF négative en mode réflecteur enregistrés après dépôt de 0,3 μL (0,237 à 1,102 nmoles déposés) de fractions de dp8 purifiées mélangées avec 0,3 μL de matrice HABA/TGM2. Les ions les plus présents dans la solution sont annotés et leur masse correspond à des adduits de sodium en mode négatif. Les pics correspondant aux dp8 vraisemblablement présents dans le mélange de départ sont soulignés. Ceux provenant d'un échange de cations ou des pertes des groupements sulfates sont annotés dans la même couleur que le dp8 d'où ils sont issus.

Pour toutes les fractions (tableau 10), les dp8 majoritaires ont pu être identifiés et sont résumés dans le tableau 10. Il étonnant que nous observions, dans certaines fractions, des dp8 n'ayant aucun groupement acétyle puisque l'Hep III fragmente les HS entre une IdoA et une GlcNAc. Ces dp8 pourraient correspondre aux extrémités des chaînes d'HS, toutefois très peu présentes. Enfin, nous remarquons également que certaines fractions contiennent des dp8 avec une même masse et donc un même nombre de groupements sulfates. Ceci est notamment le cas pour la fraction 8.13 et la fraction 8.23 qui ont la même espèce majoritaire, $[\text{dp8}, 1\text{Ac}, 6\text{SO}_3]^-$. Cependant, la concentration de sel nécessaire pour éluier ces deux fractions varie énormément, comme illustrée sur le profil d'éluion d'échanges de cations sur la figure 86. C'est pour cette raison que nous postulons que tous les groupements sulfates n'ont pas la même influence sur la charge nette de la molécule et que celle-ci dépend de leur position.

Fraction	Espèce majoritaire	Espèce minoritaire	Espèce minoritaire
8.01	[dp8, 2Ac, 3S0 ₃]		
8.02	[dp8, 1Ac, 4S0 ₃]		
8.03	[dp8, 2Ac, 4S0 ₃]	[dp8, 5S0 ₃]	
8.04	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]		
8.05	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]		
8.06	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 4S0 ₃]	
8.07	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]		
8.08	[dp8, 2Ac, 5S0 ₃]		
8.09	[dp8, 2Ac, 5S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]	[dp8, 6S0 ₃]
8.10	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 2Ac, 5S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 4S0 ₃]
8.11	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]	
8.12	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 4S0 ₃]
8.13	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]		
8.14	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]	[dp8, 7S0 ₃]
8.15	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 7S0 ₃]	
8.16	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]	[dp8, 7S0 ₃]
8.17	[dp8, 2Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 7S0 ₃]
8.18	[dp8, 2Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 7S0 ₃]
8.19	[dp8, 1Ac, 7S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 5S0 ₃]
8.20	[dp8, 1Ac, 7S0 ₃]		
8.21	[dp8, 1Ac, 7S0 ₃]	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]	
8.22	[dp8, 1Ac, 7S0 ₃]		
8.23	[dp8, 1Ac, 6S0 ₃]		

Tableau 10 : Composition des dp8 de chaque fraction.

Seuls les dp8, qui nous semblent présents dans le mélange de départ sont notés. Ceux issus de la désulfatation ne sont pas inclus dans le tableau.

II.3. Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les dp8 par « filter binding assay »

Dans un premier temps, l'affinité de l'IFN γ pour les différentes fractions de dp8 est mesurée par FBA. Ceci afin de valider que la haute affinité de l'IFN γ pour les dp8 ne dépend pas seulement de la charge des dp8. Ce faisant, nous testons l'hypothèse que seuls les groupements sulfates à des positions spécifiques sont essentiels pour l'interaction avec l'IFN γ . Quand bien même les fractions de dp8 ne contiennent pas seulement une séquence spécifique, ils sont caractérisés par des degrés de sulfations croissants.

II.3.a. Marquage en tritium d'octasaccharides

Ce marquage au tritium est basé sur la réduction de l'aldéhyde terminal du dp8 avec le borohydrure de sodium marqué au tritium et est illustré sur la figure 89 [404].

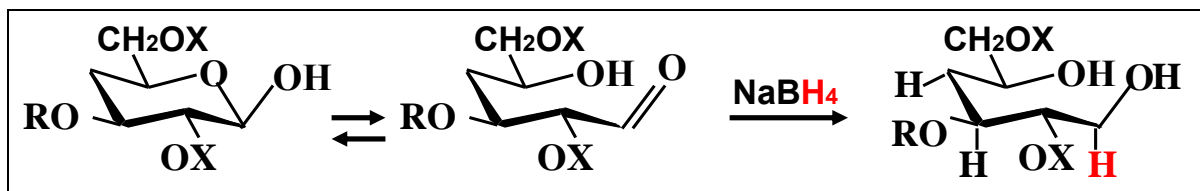


Figure 89 : Principe du marquage des dp8 au tritium.

Le sucre à l'extrémité non réduite est en équilibre entre la forme cyclique et la forme linéaire caractérisée par un aldéhyde terminal. La réduction de cet aldéhyde avec le borohydrure de sodium marqué au tritium permet le marquage des dp8 au tritium. En rouge est illustré l'hydrogène tritié incorporé au dp8.

Après le marquage des dp8 au tritium, la concentration précise des différentes fractions de dp8 doit être à nouveau déterminée. Nous avons employé le kit Blyscan[®], qui quantifie des GAG sulfatés par colorimétrie grâce à un colorant spécifique se fixant à leurs sulfates.

Puisque la banque de dp8 est séparée selon la charge globale des dp8, le taux de sulfatation présent dans chaque fraction et ainsi la fixation du colorant diffèrent fortement. C'est pour cette raison qu'une courbe d'étalonnage (figure 90) a été établie pour chaque fraction grâce à l'utilisation de la même fraction de dp8 non marquée pour laquelle la concentration exacte était connue. Cette courbe d'étalonnage est par la suite utilisée pour calculer la concentration de la même espèce de dp8 marquée au tritium. Malheureusement, la concentration des fractions 8.01 à 8.04 n'a pas pu être déterminée par cette méthode du fait de leur faible taux de sulfatation. Leur concentration a alors été estimée par défaut égale à celle de la fraction 8.05.

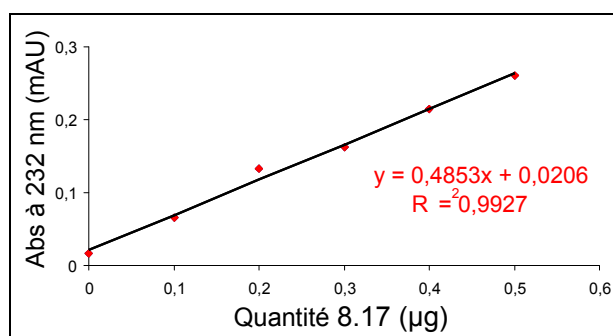


Figure 90 : Courbe d'étalonnage avec la fraction de dp8 non marquée.

Entre 0 et 0,5 µg de 8.17, non marqués au tritium et avec une concentration connue, a été colorés par le kit Blyscan[®] puis l'absorbance à une longueur d'onde de 232 nm a été mesurée. Ceci afin d'établir une courbe d'étalonnage qui a été utilisée pour déterminer la concentration du 8.17 marqué au tritium.

II.3.b. Méthode de la détermination des K_D par la linéarisation de Scatchard

La linéarisation de Scatchard permet d'obtenir précisément et facilement la constante d'affinité (K_D) à partir de la quantité de ligands liés et libres. Dans notre cas, le dp8 est le ligand et il est facilement quantifiable puisqu'il est marqué au tritium.

La particularité de cette méthode est que l'équation de la constante de dissociation est reformulée en fonction de la concentration de ligands liés (Bound-B) et libres (Free, F). Elle est par la suite réorganisée afin de représenter le ratio de la concentration de ligands liés par rapport à la concentration de ligands libres (B/F) en fonction de la concentration de ligands liés (B).

$$K_D = \frac{[F].[analyte_{libre}]}{[B]} = \frac{[F].([B_{max}] - [F])}{[B]} \Rightarrow \frac{[B]}{[F]} = -\frac{1}{K_D} \cdot [B] + \frac{1}{K_D} \cdot [B_{max}]$$

avec K_D la constante de dissociation, [F] la concentration de ligand libre, [B] la concentration de ligand lié à l'analyte, B_{max} la concentration maximum de ligands liés à l'analyte.

La représentation de cette droite (figure 91) permet d'obtenir la constante d'affinité (K_D) et la quantité maximale de ligands liés (B_{max}) d'une interaction. Cependant, il est essentiel que la quantité de ligands liés et libres soit mesurée à l'équilibre. De plus, aux concentrations élevées de ligands, ce modèle n'est pas convenable puisqu'il ne représente pas une droite. Car dans un système biologique, tous les sites d'interaction sur l'analyte ne sont jamais saturés par le ligand. En revanche, dans la gamme de concentrations, de ligands (dp8) et d'analytes (IFN γ) que nous avons utilisé, la linéarisation de Scatchard est valable.

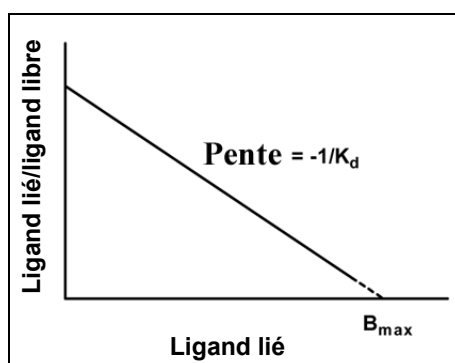


Figure 91 : Calcul de l'affinité par l'analyse Scatchard.

Cette courbe permet la détermination de l'affinité du complexe IFN γ :dp8 avec pour unique donnée la quantité de ligand, dp8, non liée et liée.

II.3.c. *Mesure d'affinité entre l'IFN γ et les dp8 par « filter binding assay »*

Afin d'évaluer l'affinité de l'IFN γ pour les différentes fractions de dp8 par FBA, 0,294 μ M d'IFN γ a été pré-incubé avec une gamme de concentration de dp8 : allant de 0,13 μ M à 1,5 μ M pour les espèces 8.06-8.23 et de 0,93 μ M à 3,3 μ M pour les espèces 8.01-8.05. Les dp8 liés et non liés ont ensuite été séparés par une membrane de nitrocellulose avant de les quantifier. La constante d'affinité est ensuite calculée *via* la linéarisation de Scatchard. Malgré l'utilisation d'une gamme de concentrations plus élevées pour les fractions 8.01 à 8.05, leur affinité probablement trop faible n'a pas pu être déterminée.

En dépit d'une imprécision des mesures, liées à la méthode (lavages de filtres), on peut tout de même remarquer de grandes différences en affinité de l'IFN γ pour les différents dp8 avec des constantes de dissociation allant de 80 nM à plus de 1000 nM. Les différences d'affinité entre les fractions 8.09 et 8.10 ou entre les fractions 8.12 et 8.13, sont étonnantes puisque ces échantillons ont *a priori* une charge comparable. D'autre part, les fractions 8.20 et 8.21 sont les dp8 les plus chargés, puisqu'éluant de la colonne échangeuse d'anions avec les concentrations de sel les plus élevées, mais ce ne sont pas les fractions les plus affines pour l'IFN γ .

Une corrélation directe entre l'affinité de l'IFN γ et la charge des différents dp8 ne semble donc pas exister. Cette première expérience soutient alors notre hypothèse qu'un profil de sulfatation particulier pourrait être à la base de la haute affinité entre l'IFN γ et les HS. Cette interaction ne semble donc pas uniquement basée sur des forces ioniques non spécifiques.

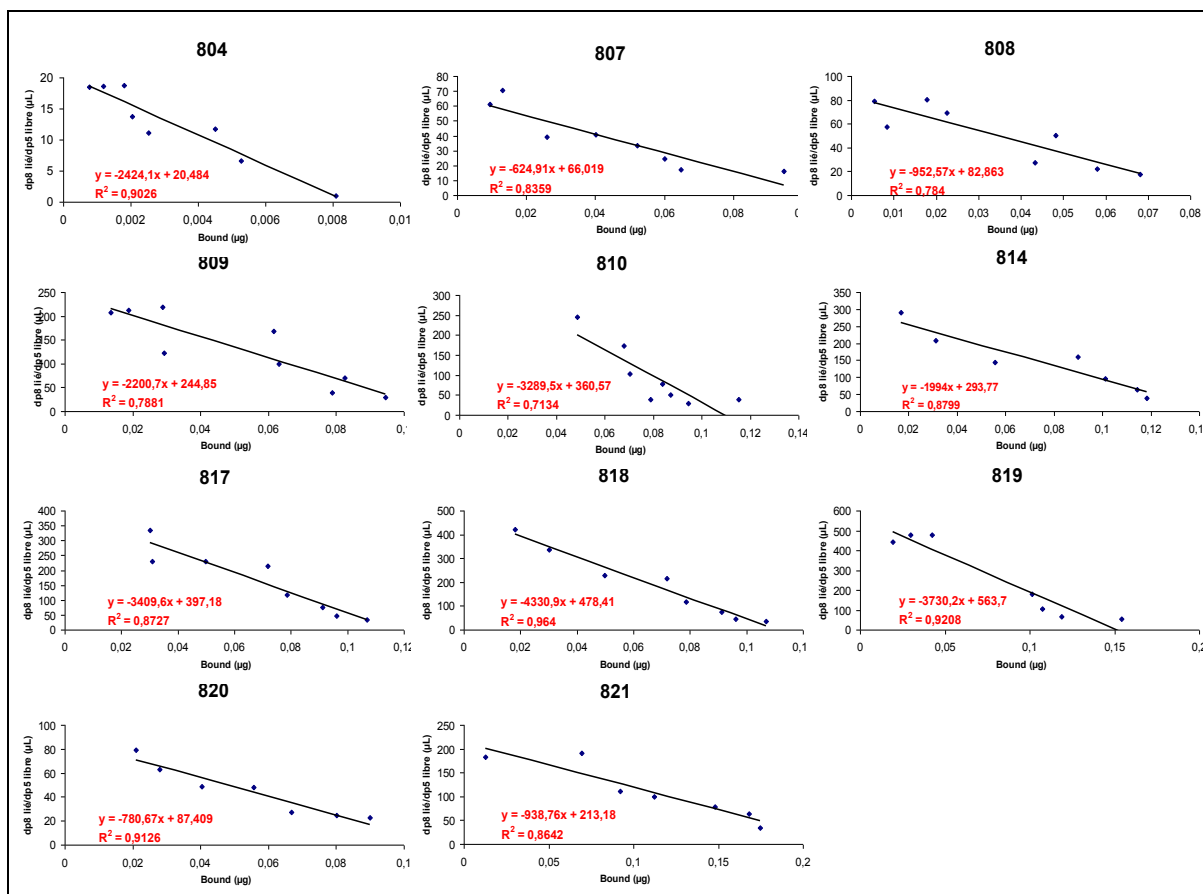


Figure 92 : Détermination de l'affinité par Scatchard des fractions de dp8.

La mesure de la quantité de dp8 liés et non liés par la mesure de leur radioactivité permet, *via* la courbe de Scatchard, la détermination de l'affinité entre l'IFN γ et cette fraction. En effet, cette courbe représente en abscisse la quantité de dp8 liés et en ordonné le rapport entre les dp8 liés et non liés. Ainsi la valeur de la constante d'affinité est calculée grâce à la pente de la courbe ($K_D = -1/\text{pente}$). Seules les fractions pour lequel le R^2 est acceptable sont représentées ici.

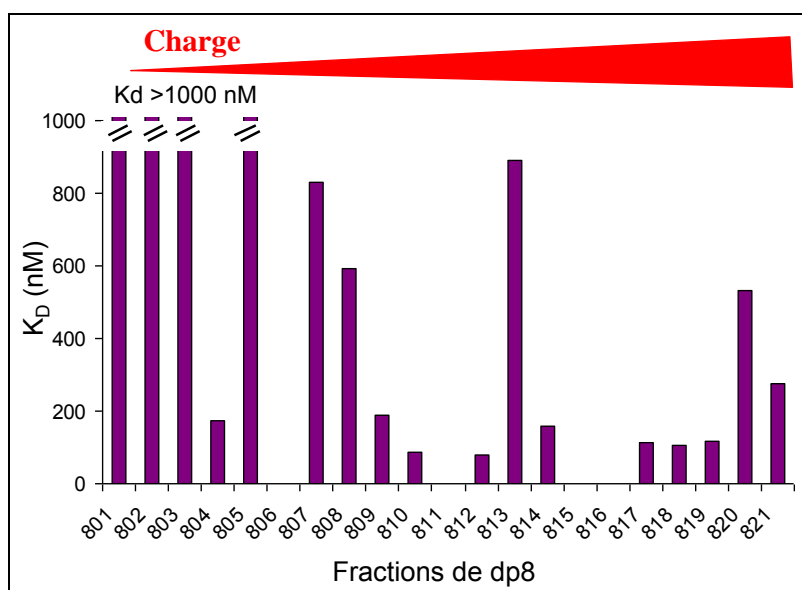


Figure 93 : Histogramme des affinités de l'IFN γ pour les différentes fractions de dp8 mesurée par FBA.

Les constantes d'affinité sont déterminées comme expliquées dans la figure 92 et les différentes fractions sont représentés par ordre croissants de charge.

II.4. Mesure de l'affinité entre l'IFN γ et les dp8 à l'aide d'un capteur fluorescent

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les résultats obtenus par FBA sont pour certains oligosaccharides peu fiables. Effectivement, malgré une quantification précise des dp8 grâce au marquage au tritium, la détermination des constantes d'affinité par cette méthode s'avère peu convaincante au vu des coefficients de corrélation de la régression linéaire. Nous avons alors souhaité quantifier les constantes d'affinité par une méthode plus directe. Grâce à une collaboration avec Mark Nitz du département de chimie de l'Université de Toronto, l'affinité entre les différentes fractions et le peptide C-terminal de l'IFN γ a été mesurée par l'emploi d'un fluorophore sensible aux halogènes.

L'affinité entre les fractions de dp8 et le peptide C-terminal de l'IFN γ couplé au fluorophore quinolium a été déterminée par titration d'une solution de 25 μ M de peptide-fluorescent avec une gamme de concentration entre 0 μ M et 350 μ M de chaque fraction de dp8. La fluorescence après chaque ajout de dp8 a été mesurée. L'ajustement de la courbe, représentant la fluorescence en fonction de la concentration de dp8, à un modèle d'interaction 1:1 permet d'évaluer la constante d'affinité entre le peptide-fluorescent et une fraction de dp8.

Malgré la sensibilité du fluorochrome, l'affinité des fractions 8.01 à 8.09 n'a pas pu être déterminée de façon précise avec la gamme de concentrations de dp8 utilisée puisque la courbe n'atteint pas une saturation. Afin d'obtenir des courbes de titration exploitables pour ces fractions, une concentration de dp8 finale au moins quatre fois supérieure à celle utilisée précédemment devrait être employée. Nous n'avons pas fait ces titrations puisque la quantité des fractions de dp8 disponible est limitée. Bien que la constante d'affinité des ces fractions (8.01-8.09) pour l'IFN γ n'a donc pas pu être déterminée, nous pouvons tout de même conclure que leur affinité est faible. En revanche, pour les fractions 8.10 à 8.23, la constante d'affinité a pu être mesurée avec une relativement bonne précision puisque les écarts type sont au maximum de 20 % de la valeur de la constante d'affinité.

Deux grands groupes de dp8 peuvent être distingués : ceux à moyenne affinité ($45 \mu\text{M} < K_D < 170 \mu\text{M}$), pour les fractions 8.10 à 8.19, et ceux à haute affinité ($K_D < 25 \mu\text{M}$), pour les fractions 8.20 à 8.23. Enfin, dans le groupe ayant une affinité moyenne, des différences d'affinité significatives ont pu être observées. D'un côté, une importante variation d'affinité a été remarquée entre la fraction 8.09 et 8.10 mais également entre la fraction 8.18 et 8.19. L'identification du changement structural entre ces fractions devrait nous indiquer des caractéristiques structurales importantes pour l'affinité de l'IFN γ pour les HS. D'un autre côté, une affinité très similaire entre les fractions 8.10, 8.11 et 8.12 a été constatée. La

caractérisation structurale de ces échantillons pourra nous révéler des groupements sulfates supplémentaires ayant pas ou très peu d'effets sur l'affinité de l'IFN γ pour les HS.

Lorsqu'on compare cette méthode avec celle du FBA, nous constatons que l'affinité mesurée entre le peptide C-terminal de l'IFN γ et les fractions de dp8 par l'utilisation du capteur fluorescent (figure 95) est plus fiable que celle obtenue entre l'IFN γ entier et les fractions de dp8 par FBA (figure 93). Malgré l'imprécision des affinités, mesurées par FBA, des similitudes avec les affinités mesurées par capteur fluorescent sont observées. Par exemple, une même différence en affinité pour la fraction 8.09 et 8.10 puis entre 8.12 et 8.13 est constatée. En revanche, l'affinité modérée des fractions 8.20 et 8.21 déterminée par FBA n'a pas confirmée la mesure d'affinité obtenue par le capteur fluorescent où ces fractions sont les plus affines pour l'IFN γ .

De même que pour le FBA, nous n'observons par l'utilisation d'un capteur fluorescent pas une corrélation directe entre l'affinité de l'IFN γ pour les différents dp8 et leur « charge ». Cette technique permet donc, avec une meilleure précision que par FBA, de soutenir l'hypothèse qu'un profil de sulfatation particulier est à la base de la haute affinité entre l'IFN γ et les HS.

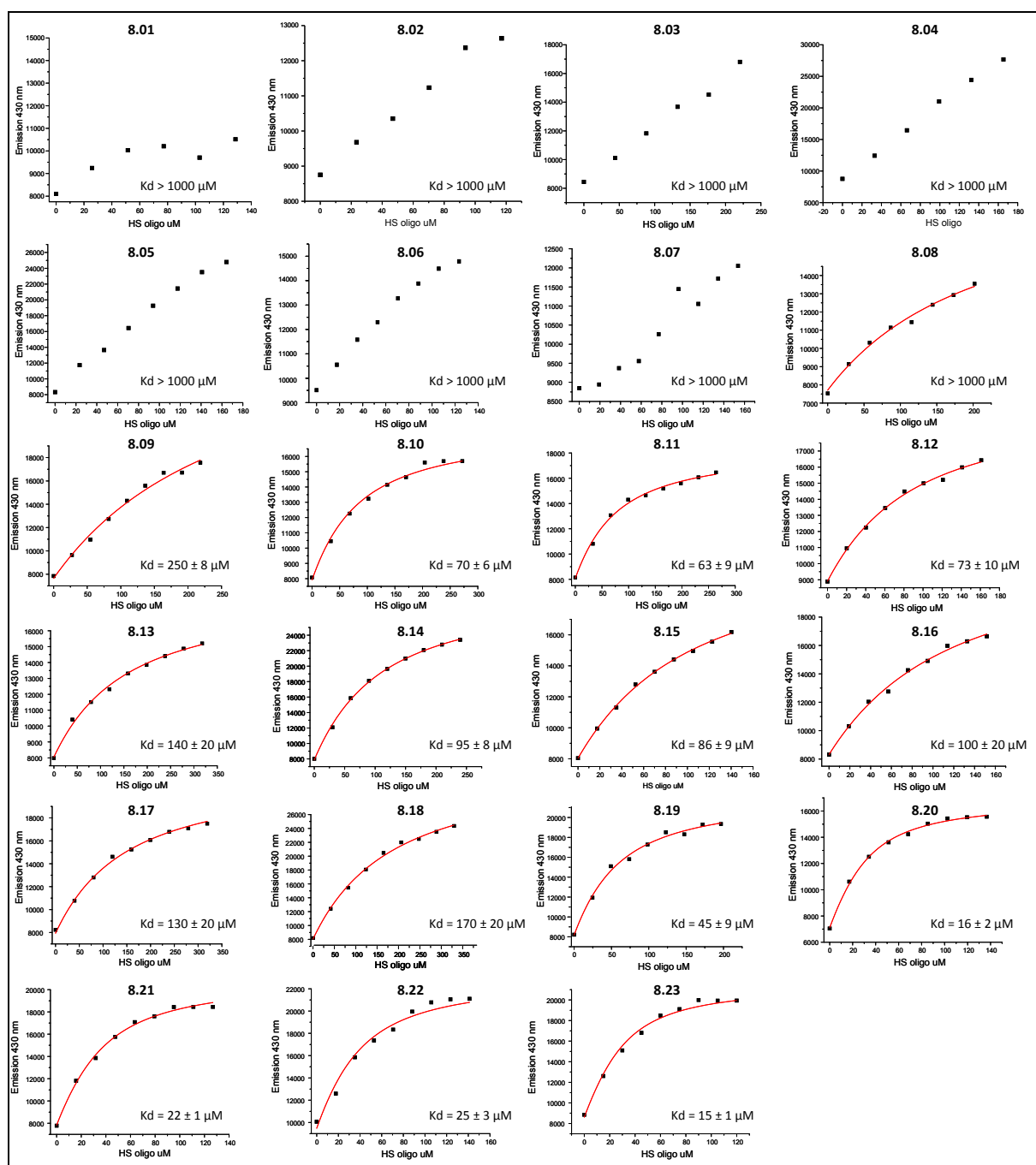


Figure 94 : Titration des fractions de dp8 avec le peptide-fluorescent.

Les fractions de dp8 issues de la banque préalablement préparée sont graduellement titrées dans 50 μL de 25 μM du peptide C-terminal de l'IFN γ associé au fluorophore 6-methoxyquinolinium dans un tampon PBS. La fluorescence après ajout de dp8 est mesurée par un spectrofluoromètre avec comme longueur d'onde d'excitation et d'émission 336 nm et 430 nm. Les courbes de fluorescence sont ensuite ajustées (courbes rouges) avec le logiciel Origin avec la méthode décrit par Rullo *et al.* [344] afin d'y extraire les constantes d'affinité.

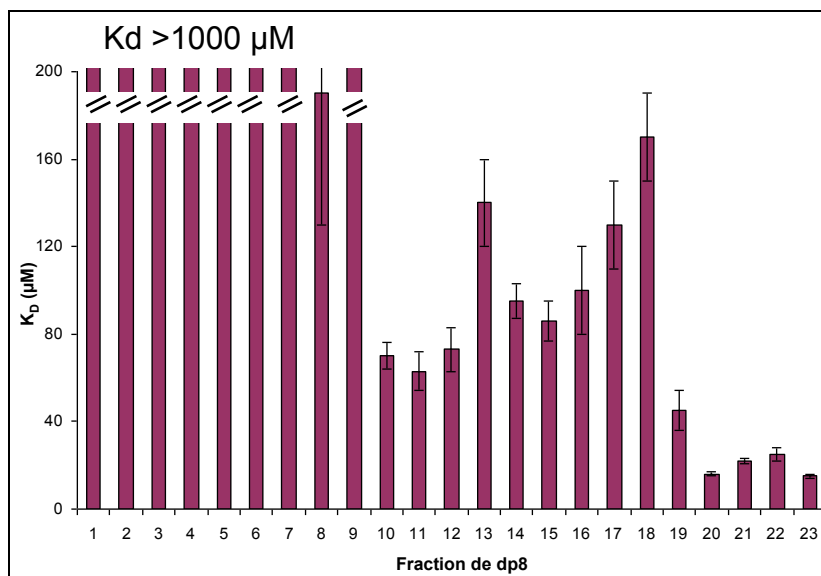


Figure 95 : Histogramme des affinités entre le peptide C-terminal de l'IFN γ et les fractions de dp8.
 Les constantes d'affinités sont déterminées comme indiquées dans la figure 94. Les titrations des fractions 8.01-8.07 et 8.09 avec le peptide fluorescent n'ont pas pu être ajusté par le logiciel, leur affinité est en conséquent faible et caractérisée par un $K_D > 1000 \mu\text{M}$.

II.5.Elution des fractions de dp8 par une colonne d'affinité

Dans les deux paragraphes précédents (II.3 et II.4), nous avons mis en avant que les différentes fractions de dp8 ont des affinités très variables pour l'IFN γ . Cependant, l'affinité ainsi mesurée est une moyenne de celle des différents dp8 éventuellement présents dans chaque fraction. En effet, les spectres de MALDI-TOF (paragraphe II.2) ont démontré pour certaines fractions de dp8 la présence de plusieurs séquences.

Afin de vérifier si l'affinité mesurée par FBA ou par l'utilisation du capteur fluorescent est due à une sous-fraction particulière ou bien à l'ensemble des séquences présentes dans la fraction de dp8, certaines fractions de dp8 seront chromatographiées sur une colonne d'affinité d'IFN γ .

II.5.a. *Elution de la banque de dp8 par la colonne d'affinité de l'IFN γ*

Tout d'abord le mélange de dp8 non fractionnés (avec lequel les différentes fractions de dp8 ont été purifiées à partir d'une colonne échangeuse d'anions) est élué de la colonne d'affinité par une concentration de sel allant de 0 M à 0,4 M de NaCl. Différents pics d'élution sont observés (figure 96.B). Le fait que le mélange de dp8 ait pu être fractionné par la colonne d'affinité, nous indique que la colonne d'affinité permet de séparer des dp8, injectés en très faible quantité, selon leur affinité pour l'IFN γ .

Certaines fractions de dp8, celles que nous avons considéré comme intéressantes au vu des résultats de la mesure de leur affinité pour l'IFN γ , ont également été analysées sur la colonne d'affinité et la concentration de sel nécessaire pour les éluer a été déterminée (figure 96.B). On peut noter que la fraction 8.01, ayant une très faible affinité pour l'IFN γ , est éluee avec moins de 0,1 M de NaCl et la fraction 8.03, dotée d'une faible affinité, est éluee avec moins de 0,2 M de NaCl. La fraction 8.09, caractérisée par une affinité moyenne pour l'IFN γ , est majoritairement éluee avec 0,2 M de NaCl. Enfin la fraction 8.21, présentant une forte affinité pour l'IFN γ contient des oligosaccharides s'éluant à haute concentration de sel. En effet, une partie de la fraction est éluee seulement en présence d'une de 0,8 M de NaCl. Une relation proportionnelle entre les constantes d'affinité des fractions de dp8 pour l'IFN γ et la concentration de sel nécessaire pour éluer ces fractions de la colonne d'affinité semble exister. L'élution des fractions 8.12 et 8.13 est, en revanche, plus compliquée à interpréter. La fraction 8.12 a été défini comme étant, considérablement, plus affine que la fraction 8.13 pour l'IFN γ . Cependant, une partie de la fraction 8.13 est éluee à une concentration de sel plus élevée que celle nécessaire pour éluer la fraction 8.12. Il est possible que cette différence provienne du fait que la constante d'affinité d'une fraction de dp8 pour l'IFN γ , mesurée par FBA ou par l'utilisation d'un capteur fluorescent, soit la moyenne pondérée de celles de différentes séquences de dp8 contenues dans la fraction. La faible affinité mesurée pour la fraction 8.13 sera alors due au fait qu'une partie des dp8 présents dans cette fraction est éluee en l'absence de sel. Ceci diminuera considérablement l'affinité moyenne mesurée malgré la présence dans la fraction de séquences de dp8 éluant avec 0,3 M de NaCl. De plus, il est possible que la mesure de l'affinité entre l'IFN γ et une fraction de dp8 et la détermination de la concentration de sel nécessaire pour éluer la fraction de dp8 de la colonne d'affinité ne correspondent pas. Ceci peut être dû au fait que cette dernière méthode est biaisée par une mesure indirecte de l'affinité, seulement basée sur des interactions électrostatiques entre l'IFN γ et les dp8. Elle ne prend pas en compte les autres forces d'interactions, comme les forces de Van der Waals ou

les liaisons hydrophobes, qui peuvent contribuer à l'affinité des dp8 pour l'IFN γ . Dans le cas des interactions des protéines:GAG, la constante d'affinité est habituellement proportionnelle aux forces ioniques, mais ceci ne peut pas être généralisée [405].

Ces expériences montrent que les fractions de dp8 sont composées de plusieurs dp8 avec des affinités pour l'IFN γ parfois très variables. Ainsi, les constantes d'affinités, déterminées par FBA ou par fluorescence à l'aide d'une étiquette quinolium, sont donc clairement une moyenne de celles des différents oligosaccharides pondérés par leur quantité. De ce fait pour certaines fractions, une partie de la fraction, ayant une séquence particulière, peut significativement augmenter ou diminuer la constante d'affinité moyenne mesurée de la fraction de dp8 pour l'IFN γ . Par exemple, on peut noter que la fraction 8.21, caractérisée par une haute affinité pour l'IFN γ , est composée de plusieurs séquences de dp8. Deux d'entre elles éluent à très haute concentration de sel (0,6 M et 0,8 M). Ce sont elles qui augmentent l'affinité moyenne mesurée de cette fraction pour l'IFN γ . Il serait intéressant d'isoler ces dp8 et de les caractériser.

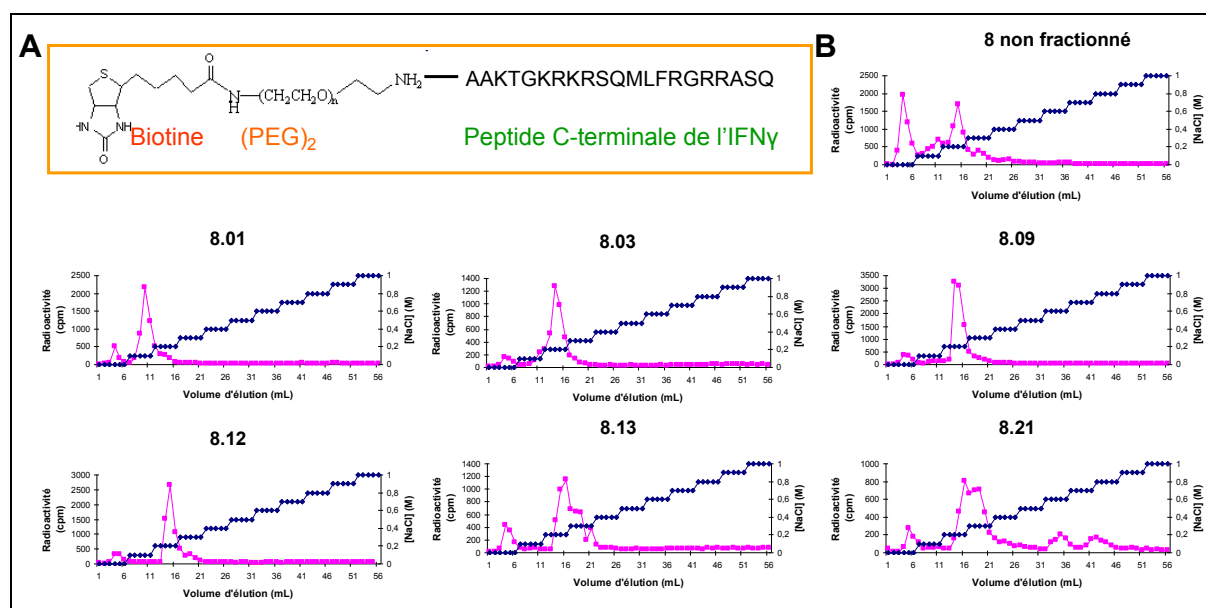


Figure 96 : Profil d'élution des fractions de dp8 par colonne d'affinité.

A. Présentation du peptide C-terminal de l'IFN γ biotinylé, immobilisé sur colonne de streptavidine. B. Profils d'élution par gradient de sel de certaines fractions de dp8 par colonne d'affinité. 10 000 cpm d'une fraction dp8 sont injectés sur la colonne d'affinité. Ces fractions sont ensuite éluées par un gradient de sel allant de 0 à 1 M par pas de 100 mM avec 5 mL de tampon par concentration de sel. L'élution des dp8 est suivie par la quantification de la radioactivité.

Afin de comprendre ces différences d'affinité des dp8 pour l'IFN γ , une analyse structurale de ces différentes espèces de dp8 ayant des très fortes affinités ou au contraire de très faibles affinités serait utile pour identifier des composants essentiels des dp8 pour lier l'IFN γ .

II.6. Analyse des complexes IFN γ :dp8 par électrophorèse capillaire

L'étude de l'affinité entre l'IFN γ et les différentes fractions de dp8, décrit dans les trois paragraphes précédents (paragraphe II.3 à II.5), a démontré de grandes variations d'affinité pour les différents dp8. Cependant, la plupart des fractions sont composées de plusieurs dp8 (paragraphe II.3). Ainsi, nous supposons que l'affinité pour l'IFN γ des différents dp8 présents dans une fraction peut varier. Afin de valider cette hypothèse et d'identifier les meilleurs ligands pour l'IFN γ , les dp8 liés à la cytokine doivent être séparés des dp8 non liés. Pour cette analyse nous avons choisi l'électrophorèse capillaire couplée avec de la spectrométrie de masse (CE-MS) qui permet la séparation des dp8 liés et libres avec l'analyse en ligne de la masse des dp8 liés.

Afin d'utiliser l'électrophorèse capillaire (CE) pour étudier l'interaction de l'IFN γ avec des dp8, nous avons vérifié que la CE permettrait effectivement la séparation de l'IFN γ seul et complexé au dp8. Pour cela, la mobilité électrophorétique de l'IFN γ seul et de l'IFN γ en complexe avec les différentes fractions de dp8 a été déterminée. Ensuite nous pouvons comparer la mobilité électrophorétique entre les différentes fractions de dp8 et les classer en fonction de leur affinité pour l'IFN γ .

L'analyse de ces interactions par CE-MS permettrait de déterminer la masse moléculaire des séquences de dp8 liant l'IFN γ . De plus, cette méthode permet d'identifier la stœchiométrie du complexe IFN γ :dp8 qui est encore incertaine. Cette méthode d'analyse a l'avantage de déterminer la stœchiométrie du complexe sans immobilisation des partenaires d'interaction ni ajout d'étiquettes.

Tous les tests d'interaction par CE ou CE-MS ont été effectués au laboratoire d'analyse et de modélisation pour la biologie et l'environnement à l'université d'Evry-Val-D'Essonne dans l'équipe de Régis Daniel, où j'ai pu faire deux séjours.

II.6.a. Calcul de la mobilité électrophorétique

Le pouvoir de la CE à séparer l'IFN γ du complexe IFN γ :dp8 a tout d'abord été vérifié en déterminant la mobilité électrophorétique de l'IFN γ seul et préincubé avec la fraction 8.23. Cette fraction a été choisie puisqu'elle est une des plus affines pour l'IFN γ . Un marqueur neutre, l'alcool benzylique, a simultanément été injecté avec chaque échantillon afin d'éviter des variations entre les différentes expériences. En effet, l'usure du capillaire peut notamment altérer la mobilité apparente mesurée pour un même échantillon.

L'électrophorégramme de l'IFN γ (figure 97) contient deux pics, un correspondant au marqueur neutre et un correspondant à l'IFN γ . Ce dernier a une mobilité électrophorétique de $(19,53 \pm 0,78) \cdot 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$. L'électrophorégramme de l'IFN γ préincubé avec la fraction 8.23, contient également deux pics. Un premier pic correspondant au marqueur neutre et un second avec une mobilité réduite par rapport à la mobilité de l'IFN γ seul. Ce second pic ($\mu_{\text{ep}} = (9,16 \pm 0,45) \cdot 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$) correspond vraisemblablement au complexe formé entre l'IFN γ et les dp8. La diminution de la migration du complexe par rapport à l'IFN γ seul est vraisemblablement due à la diminution des charges nette du complexe IFN γ :dp8 par rapport à l'IFN γ .

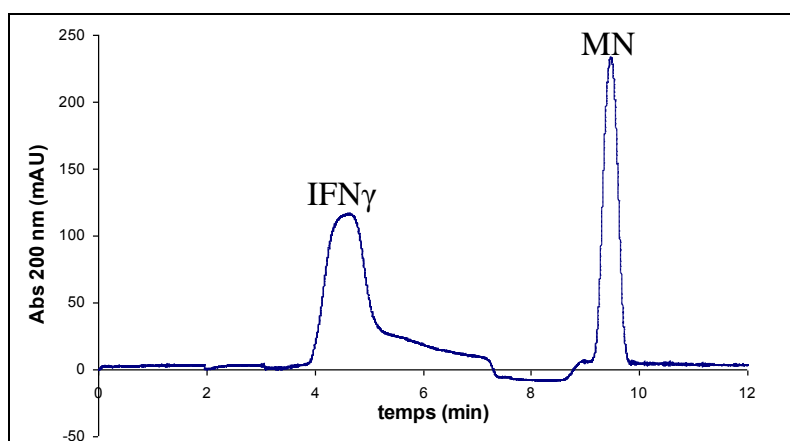


Figure 97 : Electrophorégramme de l'IFN γ .

L'IFN γ (15 μM , 75 μM NH_4Ac pH 6,5) a été injecté dans un capillaire de longueur effective 25,5 cm. L'élution de l'IFN γ et du marqueur neutre (MN) a été suivie par mesure d'absorbance à une longueur d'onde de 200 nm. Le temps de migration (min) est converti en mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$) par des relations détaillées dans le matériel et méthodes.

Cette méthode a ensuite été utilisée pour analyser la migration de l'IFN γ dans le capillaire en fonction de son éventuelle interaction avec les différentes fractions de dp8. A concentration équimolaire de l'IFN γ et de dp8, des différences en mobilité électrophorétique de l'IFN γ sont remarquées entre les différentes fractions (figure 98 et 99). Ceci indique et confirme de nouveau que les différents dp8 interagissent différemment avec l'IFN γ . Cependant, il faut noter que cette méthode ne quantifie pas l'affinité de l'IFN γ pour ces fractions.

Pour les fractions très peu sulfatées, comme par exemple 8.01 et 8.02, un pic avec la même mobilité électrophorétique de l'IFN γ est observé, probablement correspondant à de l'IFN γ non complexé. Un pic avec une mobilité électrophorétique légèrement plus faible est néanmoins observé, probablement correspondant à une faible interaction IFN γ :dp8. Pour les fractions très sulfatées, seul un pic avec une mobilité électrophorétique très réduite ($\mu_{\text{e}} < 1 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$), correspondant vraisemblablement au complexe IFN γ :dp8, est remarqué.

Enfin, pour les fractions intermédiaires, les résultats sont plus compliqués à interpréter. En effet, pour certaines fractions, comme la fraction 8.06 et 8.15, un seul pic d'élution avec une mobilité électrophorétique réduite par rapport à l'IFN γ est observé. En revanche, pour d'autres fractions, comme les fractions 8.09, 8.14 et 8.18, deux pics d'élution sont observés. Un premier pic avec une mobilité comparable à celle de l'IFN γ puis un second pic avec une mobilité très réduite par rapport à celle de l'IFN γ . Enfin, pour la fraction 8.04, deux pics d'élution sont également observés mais tous deux avec une mobilité réduite par rapport à celle de l'IFN γ . La présence de multiples pics d'élution avec des mobilités électrophorétiques variables peut être due à cinq raisons : (1) la présence simultanée de l'IFN γ complexé et non complexé, (2) la formation de différents complexes entre l'IFN γ et différents oligosaccharides présents dans une fraction, (3) la formation de complexes IFN γ :dp8 avec une stœchiométrie variable (1:1 ou 1:2), (4) la présence d'un équilibre rapide entre l'IFN γ libre et un ou plusieurs complexes IFN γ :dp8, ou (5) une contamination de la préparation de l'IFN γ ou des dp8.

La difficulté rencontrée avec cette méthode est que les pics d'élution de l'IFN γ ou ceux provenant, vraisemblablement, de complexes IFN γ :dp8 sont très larges (figure 98). Ceci rend l'interprétation des profils d'élution par CE complexe. Malgré cela, des similitudes avec les constantes d'affinités entre l'IFN γ et les fractions de dp8 (figure 95) peuvent être remarquées. En effet, les fractions avec les mobilités les plus réduites (fractions 8.19 à fraction 8.23) sont celles avec les affinités les plus fortes ($K_D < 45 \mu\text{M}$). De même la forte différence de mobilité électrophorétique entre la fraction 8.19 et 8.18 reflète la forte augmentation de l'affinité pour l'IFN γ entre la fraction 8.19 par rapport à la fraction 8.18.

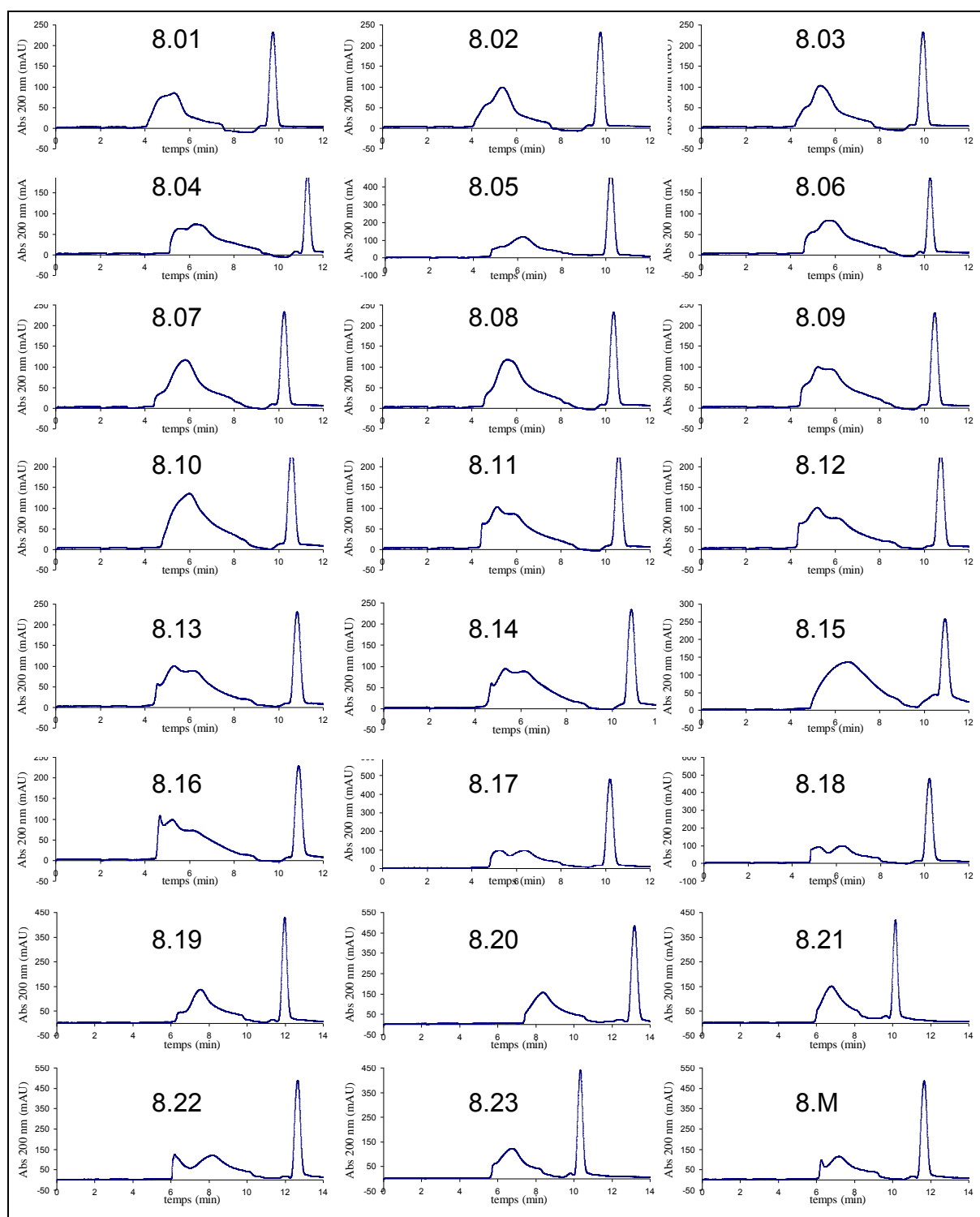


Figure 98 : Electrophorégrammes de mélanges préincubés de l'IFN γ avec les fractions de dp8.

L'IFN γ (15 μ M, 75 μ M NH $_4$ Ac pH 6,5) a été préincubé pendant 1 h à température ambiante avec les différents dp8 (15 μ M, 75 μ M NH $_4$ Ac pH 6,5) avant d'être injecté dans un capillaire de longueur effectif 25,5 cm. L'élution de l'IFN γ , du complexe et du marqueur neutre est suivie par mesure d'absorbance à une longueur d'onde de 200 nm.

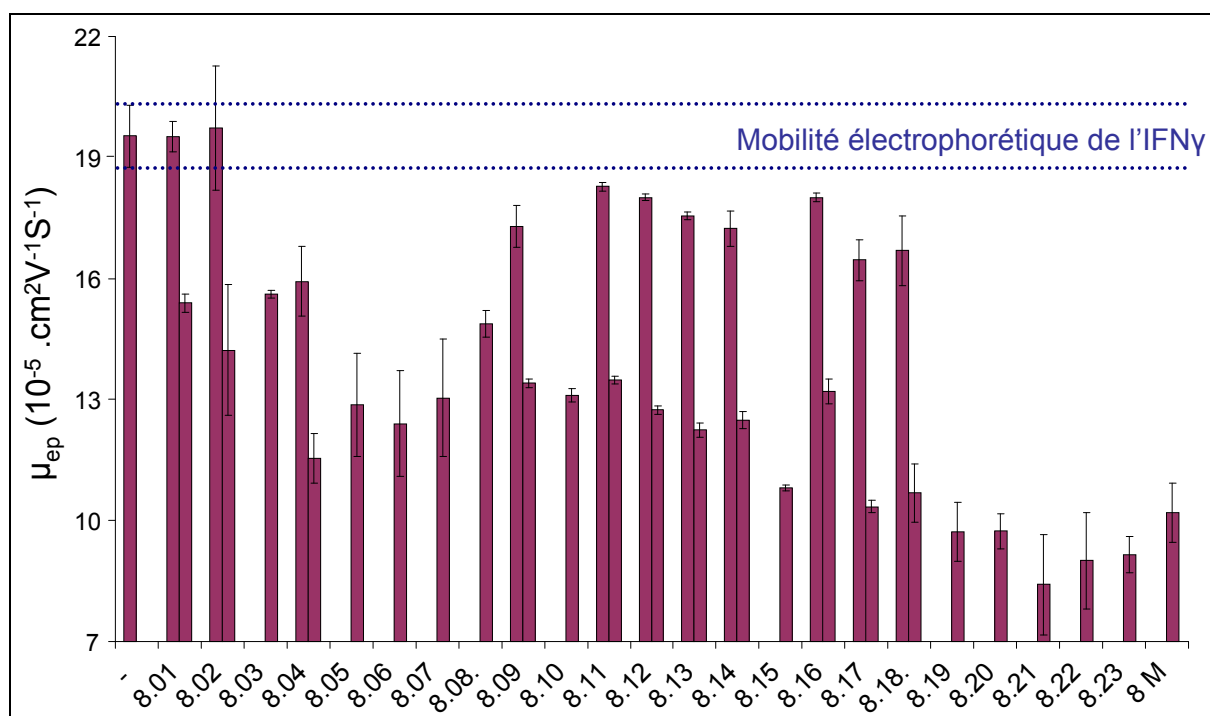


Figure 99 : Histogramme des mobilités électrophorétiques de l'IFN γ et du mélange de l'IFN γ avec les fractions de dp8.

La mobilité électrophorétique (relative à celle de l'alcool benzylique) a été reportée en fonction de la fraction avec laquelle l'IFN γ a été préincubé. Pour certaines fractions, deux pics d'élution (hors celui du marqueur neutre) ont été identifiés, un avec une mobilité électrophorétique semblable à celui d'IFN γ seul, puis un avec une mobilité électrophorétique réduite. Pour d'autres fractions, seul ce dernier pic a été observé.

II.6.b. *Couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse*

Dans le paragraphe précédent, nous avons démontré que la CE permet la séparation de l'IFN γ seul de celui en complexe avec des dp8 ainsi que la séparation des dp8 liés à l'IFN γ que ceux restant non liés. Cependant, dans cette expérience l'élution de l'échantillon est uniquement détectée par l'absorbance de l'IFN γ à une longueur d'onde de 200 nm. Grâce au couplage de la CE à la MS, la masse de l'échantillon peut être analysée en ligne, sans étapes supplémentaires de purification de celui-ci. Si les conditions d'ionisation de l'échantillon sont choisies natives ou non dénaturantes, les complexes non-covalents entre l'IFN γ et les dp8 peuvent être détectés. De plus, dans le paragraphe II.2, nous avons déterminé la masse moléculaire des composants majeurs présents dans chaque fraction de dp8. Ceci nous aidera à interpréter les spectres de la CE-MS obtenus. Pour ces expériences, des concentrations équimolaires d'IFN γ et de dp8 ont été choisies afin de favoriser la formation et la détection du complexe IFN γ :dp8. Ainsi, à partir d'un mélange de dp8 nous pouvons espérer identifier celui qui formera un complexe avec l'IFN γ . Si les ions détectés correspondent à un seul complexe IFN γ :dp8 et différents dp8 sont présents dans la fraction initiale, cette méthode nous

permettra de discerner quel dp8 fixe la protéine et est ainsi responsable de la forte affinité de la fraction pour l'IFN γ .

Un premier spectre de masse (figure 100) a été obtenu par CE-MS après injection de l'IFN γ seul. Les ions de rapport m/z obtenus : 2604,3 (13+), 2819,4 (12+), 3075,1 (11+) et 3414,2 (10+), conduisent à une masse moléculaire de $33824,7 \pm 12,5$ de g.mol $^{-1}$ correspondant à l'homodimère de l'IFN γ (MM théorique = 33815.2 g.mol $^{-1}$). Du fait de l'utilisation de la gamme de masse étendue (200-6000 m/z) du spectromètre, la masse détectée est moins précise, comme remarqué par la différence en masse moléculaire de l'IFN γ entre la masse moléculaire théorique et mesurée. De plus, l'intensité des ions est relativement faible du fait de la masse moléculaire élevée de la protéine qui, dans des conditions natives, s'ionise mal [406].

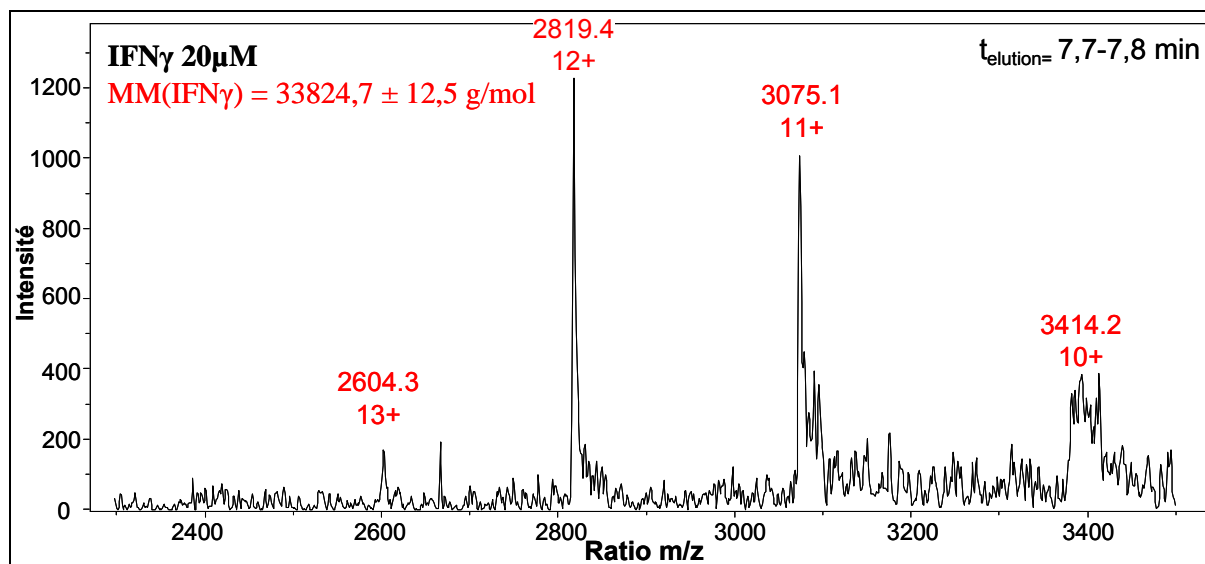


Figure 100 : Spectre de masse de l'IFN γ analysé par CE-MS.

L'IFN γ (20 μ M, 75 μ M NH $_4$ Ac pH 6,5) a été injecté dans un capillaire de longueur effective 98 cm. Cette CE est couplée à la MS, du liquide d'addition (20 μ M NH $_4$ Ac pH 5,0) est apporté par un pousse seringue à un débit de 3 μ L/min. Les conditions d'ionisation sont non-dénaturantes. Le temps d'élution du spectre a été annoté ainsi que les ions correspondant à l'IFN γ . La masse moléculaire de l'IFN γ a été calculée.

L'interaction de l'IFN γ avec la fraction 8.23 a ensuite été analysée par CE-MS. Cette fraction a été choisie car il s'agit d'une des fractions les plus affines pour l'IFN γ qui semble, d'après l'analyse par MALDI-TOF, contenir qu'un seul dp8 [dp8, 1Ac, 6SO $_3$] (paragraphe II.2). Le spectre de cette fraction par CE-MS (figure 101) contient en plus des ions caractéristiques de l'IFN γ , avec une masse moléculaire de $33820,9 \pm 13,2$ g.mol $^{-1}$, une autre série d'ions : 2753,1 (13+), 2986,6 (12+) et 3253,9 (11+). Cette seconde série d'ions conduit à une masse moléculaire de $35778,7 \pm 2,9$ g.mol $^{-1}$ correspondant au complexe non covalent formé par un homodimère de l'IFN γ et un dp8 de masse moléculaire de 1957,8 g.mol $^{-1}$ correspondant à la structure [dp8, 1Ac, 7SO $_3$] (MM théorique 1985,6 g.mol $^{-1}$). Cependant, l'intensité de cette

seconde série d'ions est beaucoup plus faible que celle correspondant à l'IFN γ . Ceci n'indique pas nécessairement qu'une faible quantité de complexe ait été formé puisque l'intensité dépend surtout de la capacité du complexe à être ionisé. Etant donné que le nombre de charges exposées dans le complexe est inférieur à celui de l'IFN γ seul, le complexe a tendance à moins bien s'ioniser.

Il est très étonnant que le dp8 observé par MALDI-TOF ([dp8, 1Ac, 6SO₃]) et par CE-MS ([dp8, 1Ac, 7SO₃]) soit différent. Deux explications sont possibles : (1) Le dp8 [dp8, 1Ac, 7SO₃] est présent dans la fraction 8.23 mais à très faible concentration. De ce fait, il n'est pas détectable par MALDI-TOF. Cependant, nous l'observons par CE-MS puisqu'il est extrêmement affin pour l'IFN γ . (2) Le dp8 détecté par MALDI-TOF [dp8, 1Ac, 6SO₃] est en fait un dp8 [dp8, 1Ac, 7SO₃] complètement désulfaté sur une position par les conditions utilisées en MALDI. Néanmoins, ceci est peu probable puisque dans notre expérience, l'ionisation de dp8 (y compris de synthèse) n'a jamais conduit à la perte d'un groupement sulfate sur l'ensemble de l'échantillon analysé par cette méthode [331].

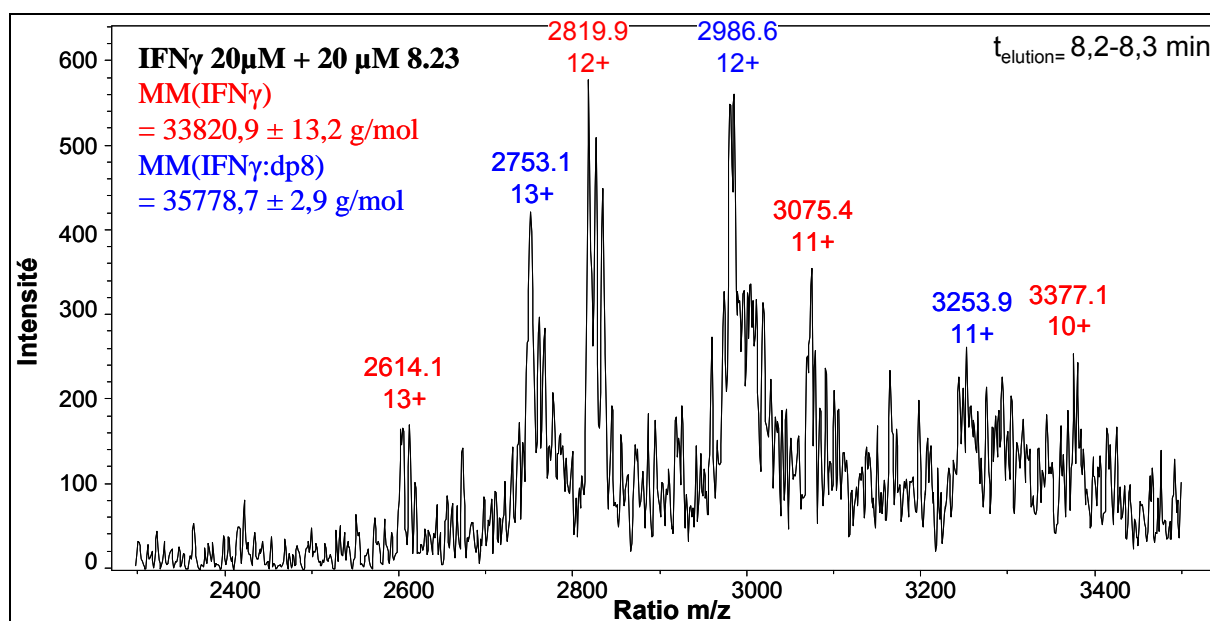


Figure 101 : Spectre de masse de l'IFN γ préincubé avec la fraction 8.23 analysé par CE-MS.

L'IFN γ (20 μ M, 75 μ M NH₄Ac pH 6,5) a été préincubé pendant 1 h à température ambiante avec la fraction 8.23 (20 μ M, 75 μ M NH₄Ac pH 6,5) avant d'être analysé par CE-MS comme indiqué sur la figure 100. Le temps d'élution du spectre a été annoté ainsi que les ions correspondant à l'IFN γ et du complexe IFN γ :dp8. La masse moléculaire de l'IFN γ et du complexe a été calculée.

Après avoir contrôlé la capacité de la CE-MS à observer un complexe IFN γ :dp8, nous avons analysé l'interaction de l'IFN γ avec certaines fractions que nous avons considérées comme intéressantes. Ainsi, des couples de fractions, avec des affinités variables mais une charge

globale similaire, ont été investigués. Les fractions 8.08 et 8.10, 8.12 et 8.13, 8.17 et 8.19 (figure 102) ont été choisies pour cela.

Pour la fraction 8.08 ($K_D = 190 \mu\text{M}$), 8.13 ($K_D = 140 \mu\text{M}$), 8.17 ($K_D = 130 \mu\text{M}$), seul l'IFN γ a été détecté. Cependant, pour la fraction 8.10 ($K_D = 70 \mu\text{M}$), l'IFN γ ($MM = 33819,3 \pm 4,0 \text{ g.mol}^{-1}$) et un complexe IFN γ :dp8 ($MM = 35687,2 \pm 8,5 \text{ g.mol}^{-1}$) ont été détectés. La masse moléculaire correspond à un complexe 1:1 formé entre l'IFN γ et l'un dp8 [dp8, 1Ac, 6SO₃] ($MM_{\text{mesuré}} = 1867,9 \text{ g.mol}^{-1}$ et théorique $1871,5 \text{ g.mol}^{-1}$). Ce dp8 est un des deux dp8 présent, en quantité approximativement équivalente, dans la fraction 8.10. Nous pouvons donc supposer que l'IFN γ interagit seulement avec ce dp8 et non avec le dp8 [dp8, 2Ac, 5SO₃] également présent dans la fraction.

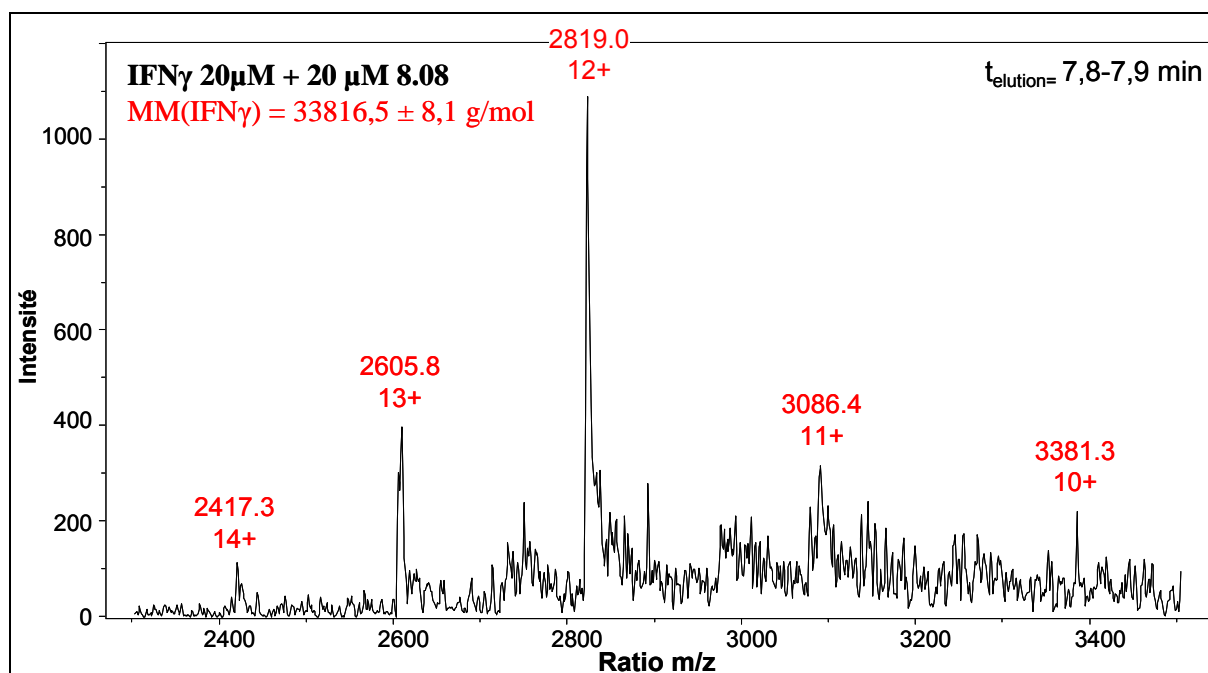
Pour la fraction 8.12 ($K_D = 73 \mu\text{M}$), l'IFN γ ($MM = 33819,7 \pm 5,4 \text{ g.mol}^{-1}$) et un complexe IFN γ :dp8 ($MM = 35690,4 \pm 5,2 \text{ g.mol}^{-1}$) ont été détectés. La masse moléculaire correspond à un complexe 1:1 formé entre l'IFN γ et un dp8 [dp8, 1Ac, 6SO₃]. Ce dp8 est l'espèce majoritaire présente dans la fraction 8.12. Nous ne pouvons pas conclure que les autres dp8 ([dp8, 1Ac, 6SO₃] et [dp8, 7SO₃]) présents dans la fraction, n'interagissent pas avec l'IFN γ . En effet, il est possible que ces complexes entre l'IFN γ et ses dp8 ont été formés mais que les pics correspondant à ces complexes sont de trop faible intensités pour être observés.

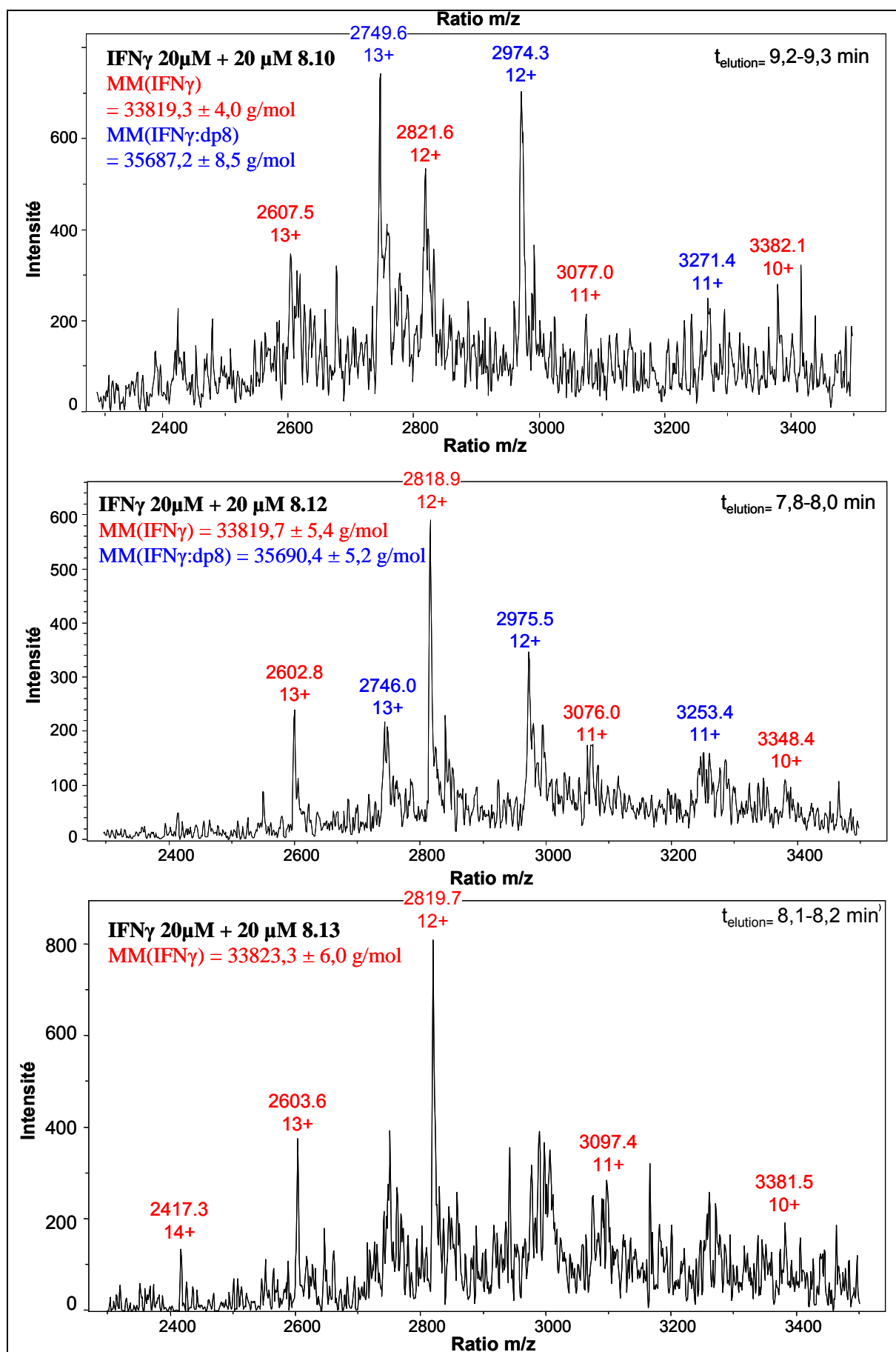
Pour la fraction 8.19 ($K_D = 45 \mu\text{M}$), l'IFN γ ($MM = 33824,4 \pm 13,7 \text{ g.mol}^{-1}$) et un complexe IFN γ :dp8 ($MM = 35774,0 \pm 6,3 \text{ g.mol}^{-1}$) ont été détectés. La masse moléculaire correspond à un complexe 1:1 formé entre l'IFN γ et un dp8 [dp8, 1Ac, 7SO₃]. Ce dp8 est l'espèce majoritaire présente dans la fraction 8.19. Pour la même raison que celle soulevée pour la fraction 8.12, nous ne pouvons pas conclure que l'autre dp8 [dp8, 1Ac, 6SO₃] présent dans la fraction n'interagisse pas avec l'IFN γ .

Somme toute, l'analyse de ces fractions, semble indiquer que seuls des complexes avec un K_D inférieur à $100 \mu\text{M}$ peuvent être détectés par CE-MS. Le CE-MS est ainsi donc capable de différencier des dp8 interagissant avec l'IFN γ à haute affinité de ceux interagissant à faible affinité.

En effet, pour une fraction particulière, la fraction 8.10, seul un des deux dp8 présents, en quantité équimolaire, dans la fraction initiale interagit avec l'IFN γ . Pour cette fraction, c'est donc uniquement le dp8 [dp8, 1Ac, 6SO₃] qui est responsable de la haute affinité mesurée pour l'IFN γ . D'autre part, pour la fraction 8.23, nous supposons qu'un dp8 [dp8, 1Ac, 6SO₃], présent en très faible quantité dans la fraction, est le seul dp8 liant l'IFN γ . En effet, aucuns ions correspondant à d'autre complexe IFN γ :dp8 n'ont été détecté. Ceci malgré la présence d'un dp8 plus sulfaté [dp8, 1Ac, 7SO₃] présent en grande quantité. En revanche, pour les

fractions 8.12 et 8.19, seule l'espèce majoritaire semble interagir avec l'IFN γ . Etant donné que les autres espèces sont présentes dans des concentrations plus faibles, nous ne pouvons pas conclure avec certitude que ces dp8 n'interagissent pas avec l'IFN γ puisqu'il est également possible que les ions correspondant à l'interaction de ses dp8 avec l'IFN γ sont de trop faible intensité pour être dissociables du bruit de fond. La sensibilité de détection de cette technique est donc limitée par la faible ionisation du complexe. Une solution pourrait être de séparer les dp8 liés à l'IFN γ de ceux qui restent non liés par CE puis de les analyser par ESI dans des conditions dénaturantes en mode négatif où seuls les dp8 seront détectés.





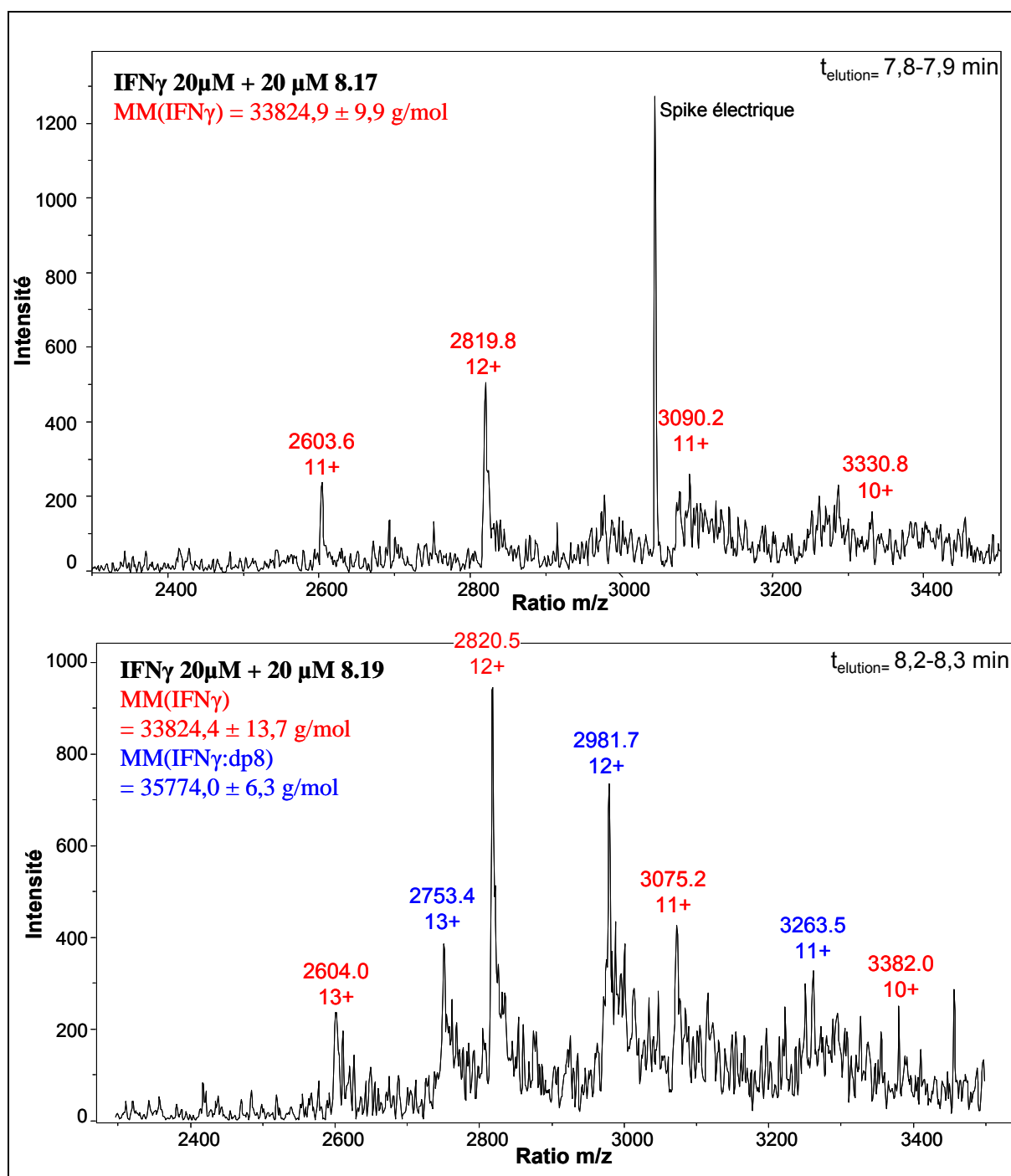


Figure 102 : Spectres de masse de l'IFN γ préincubé avec différents dp8 analysés par CE-MS.
 L'IFN γ (20 μ M, 75 μ M NH $_4$ Ac pH 6,5) a été préincubé pendant 1 h à température ambiante avec les différents dp8 - 8.08, 8.10, 8.12, 8.13, 8.17 et 8.19 - (20 μ M, 75 μ M NH $_4$ Ac pH 6,5) avant d'être analysés par CE-MS comme indiqués sur la figure 100. Le temps d'élution du spectre a été annoté ainsi que les ions correspondant à l'IFN γ et du complexe IFN γ :dp8. La masse moléculaire de l'IFN γ et du complexe, si présent, a été calculée.

Dans l'hypothèse de retenir seuls les dp8 très affins pour l'IFN γ , nous avons analysé l'interaction de l'IFN γ avec les dp8 non fractionnés (8M). Deux conditions ont été étudiées, l'IFN γ et le 8M à concentration équimolaire ou l'IFN γ avec une concentration dix fois supérieure à celle du 8M (figure 103). Cependant, l'analyse par CE-MS de ces deux

conditions ne permet pas de détecter de complexes IFN γ :dp8. Ceci n'indique pas nécessairement qu'aucun complexe IFN γ :dp8 n'est formé. Nous supposons plutôt que différents dp8, avec différentes masses moléculaires, lient l'IFN γ . De ce fait, les signaux, correspondant à un complexe IFN γ :dp8 particulier, sont moins intenses puisque plusieurs complexes sont formés. En effet, étant donné que les complexes s'ionisent mal, ces signaux correspondant aux complexes sont difficilement dissociables du bruit de fond.

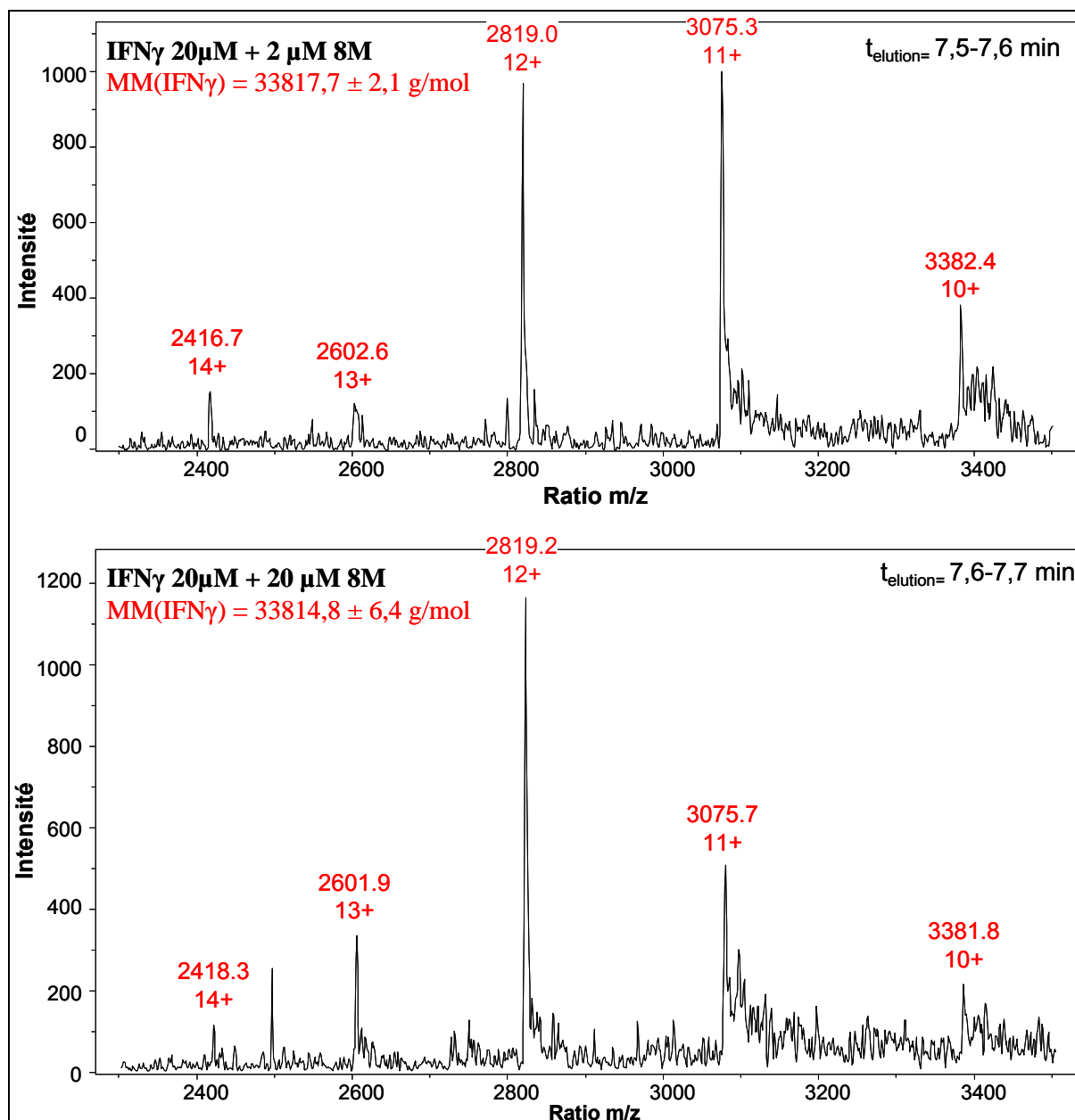


Figure 103 : Spectres de masse de l'IFN γ préincubé avec le dp8 non fractionnés analysés par CE-MS. L'IFN γ (20 μ M, 75 μ M NH $_4$ Ac pH 6,5) a été préincubé pendant 1 h à température ambiante avec la fraction dp8 non fractionnés (2 ou 20 μ M, 75 μ M NH $_4$ Ac pH 6,5) avant d'être analysé par CE-MS comme indiqué sur la figure 100. Seuls des ions correspondant à l'IFN γ ont été détectés. Le temps d'élution du spectre a été annoté ainsi que les ions correspondant à l'IFN γ . La masse moléculaire de l'IFN γ a été calculée.

dp8	MM(IFN γ) (Da)	MM(IFN γ :dp8) (Da)	MM(dp8) (Da)	structure dp8
IFN γ seul	33817,7 \pm 12,5	-	-	-
8M				
20 μ M 8M	33817,7 \pm 2,1	-	-	-
2 μ M 8M	33814,8 \pm 6,4	-	-	-
fraction dp8				
20 μ M 8.08	33816,5 \pm 8,1	-	-	-
20 μ M 8.10	33819,3 \pm 4,0	35687,2 \pm 8,5	1867,9	[dp8, 1Ac, 6SO ₃]
20 μ M 8.12	33819,7 \pm 5,4	35690,4 \pm 5,2	1870,70	[dp8, 1Ac, 6SO ₃]
20 μ M 8.13	33823,3 \pm 6,0	-	-	-
20 μ M 8.17	33824,9 \pm 9,9	-	-	-
20 μ M 8.19	33824,4 \pm 13,7	35774,0 \pm 6,3	1949,60	[dp8, 1Ac, 7SO ₃]
20 μ M 8.23	33820,9 \pm 13,2	35778,7 \pm 2,9	1957,80	[dp8, 1Ac, 7SO ₃]

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des masses moléculaires obtenues par CE-MS.

II.7. Conclusion

Une banque de dp8, contenant 23 fractions différentes de dp8 avec des degrés de charge croissants, a tout d'abord été purifiée à partir d'HS issu de muqueuse intestinale de porc [405]. Le grand avantage de préparer une banque d'oligosaccharides à partir d'une source naturelle d'HS est qu'elle devrait contenir l'intégralité de la variabilité structurale présente dans les HS de départ. Des quantités suffisantes de chaque fraction de dp8 ont été obtenues permettant l'analyse de leur affinité pour l'IFN γ par différentes techniques. Avant de débiter les tests d'interaction, nous avons effectué une analyse structurale de ces fractions par MALDI-TOF-MS. Dans la littérature, une telle analyse d'une banque d'oligosaccharide est extrêmement rare [407]. Une matrice ILM (HABA-TMG₂) a été utilisée pour augmenter la sensibilité de l'analyse et diminuer la perte des groupements sulfates. Les dp8 contiennent un ou deux acétyles et trois à huit groupements sulfates, ce nombre restreint de groupements sulfates est caractéristique des HS [408]. Cette analyse a permis de démontrer les limites de résolution de la colonne Propac PA1 (9 mm x 250 mm). En effet, la colonne est incapable de séparer les différentes séquences de dp8 présentes dans le mélange initial, probablement parce que leur

nombre est trop élevé et que leur charge nette est trop proche. De ce fait, les fractions de dp8 contiennent souvent plus qu'une séquence de dp8. D'autre part, nous remarquons que les dp8, avec une même masse moléculaire et donc avec un même nombre de groupements sulfates, sont élués avec des concentrations de sel variables. Ceci nous indique que la répartition des groupements sulfates modifie le caractère électrostatique de la molécule, et ses capacités d'interaction.

Dans le but de comprendre la relation structure-fonction des HS, différents tests d'interaction avec l'IFN γ ont été entrepris. Pour cela nous avons employé des fractions de dp8, ayant des degrés de charge croissants, et soit l'IFN γ soit son domaine de reconnaissance des HS, c'est-à-dire le peptide C-terminal (résidu 125 à 143). Les résultats du FBA, des expériences utilisant un capteur fluorescent et de chromatographie d'affinité démontrent que certaines fractions de dp8 lient l'IFN γ plus que d'autres. De plus, l'affinité de ces fractions pour l'IFN γ n'est pas proportionnelle à leur degré de sulfatation. De ce fait, nous supposons que le positionnement des groupements sulfates est important pour l'affinité entre le dp8 et l'IFN γ . D'autres facteurs, comme le niveau d'épimérisation des GlcA en IdoA, peuvent être également importants, mais ne sont pas pris en compte dans notre analyse. Notre hypothèse est que l'IFN γ lie certaines séquences de dp8 préférentiellement.

Afin de pleinement comprendre les différences d'affinités de ces fractions pour l'IFN γ , une étape clé est leur analyse disaccharidique [409]. En effet, en comparant la composition disaccharidique de ces fractions, nous pouvons en déduire les éléments structuraux importants pour l'interaction avec l'IFN γ . D'autre part, des coupures chimiques et enzymatiques peuvent compléter l'analyse structurale des dp8 [339]. Par exemple, une digestion des dp8 par l'acide nitreux coupe uniquement les liaisons glycosidiques adjacentes à une GlcNS. Ainsi, si un dp8 contient une GlcNac dans le second sucre, un hexasaccharide et un disaccharide seront obtenus. De cette manière les positions de N-acétylation peuvent être identifiées.

Un problème réside toutefois dans les quantités de dp8 dont nous disposons. Ainsi, les quantités nécessaires pour élucider la structure des dp8 en les détectant par absorbance à 232 nm sont trop importantes. Néanmoins, l'existence de marqueurs fluorescents, tels que le bodipy-FL-hydrazide, ou l'usage d'oligosaccharides marqués au tritium permet de diminuer considérablement la concentration de dp8 détectables [339, 409-410]. De cette manière, la quantité de dp8 présente dans notre banque serait suffisante pour effectuer une analyse structurale complète comprenant l'analyse disaccharidique et l'analyse par coupure chimique et enzymatique.

Enfin, si les éléments structuraux de dp8 essentiels pour lier l'IFN γ sont identifiés, ils pourront être utilisés pour conduire la synthèse d'un inhibiteur de l'IFN γ . Un tel inhibiteur [320] a déjà été conçu basé sur le modèle d'interaction proposé par précédemment [304]. Cependant, dans cette molécule, appelée 2O₁₀, les dp8 sont sulfatés de manière homogène sur les positions N- et 6-O des glucosamines et 2-O des acides iduroniques (séquence régulière de l'Hp). En y insérant, uniquement les groupements sulfates et les épimérisations importantes pour l'interaction avec l'IFN γ , l'affinité mais surtout la spécificité de cette molécule pour l'IFN γ devraient être augmentées [40, 187, 411]. La spécificité d'une telle molécule inhibitrice de l'interaction IFN γ :HS est primordiale puisque de nombreuses protéines lient les HS et ces interactions régulent une multitude d'activités biologiques.

*Cristallisation du complexe
IFN γ :oligosaccharide de type Hp*

III. Cristallisation du complexe

IFN γ :oligosaccharide de type Hp

Une connaissance des éléments structuraux importants pour l'interaction de l'IFN γ avec les HS est primordiale pour la conception d'un oligosaccharide à but thérapeutique qui empêcherait la signalisation de l'IFN γ . Un premier mime de la séquence oligosaccharidique liant l'IFN γ a déjà été conçu [320-321] et est illustré sur la figure 104. Ce mime, appelé 2O₁₀, est composé de deux dp8 de type Hp maintenus à une certaine distance grâce à un groupement poly(éthylèneglycole)₁₀ interne d'une longueur de 50 Å. Cependant, dans la molécule 2O₁₀ les deux dp8 sont sulfatés de manière homogène sur les positions N- et 6-O des glucosamines et 2-O des acides iduroniques (séquence régulière de l'Hp). En y insérant, uniquement les groupements sulfates et les épimérisations importantes pour l'interaction avec l'IFN γ , l'affinité mais surtout la spécificité de cette molécule pour l'IFN γ devraient être augmentées [40, 187, 411].

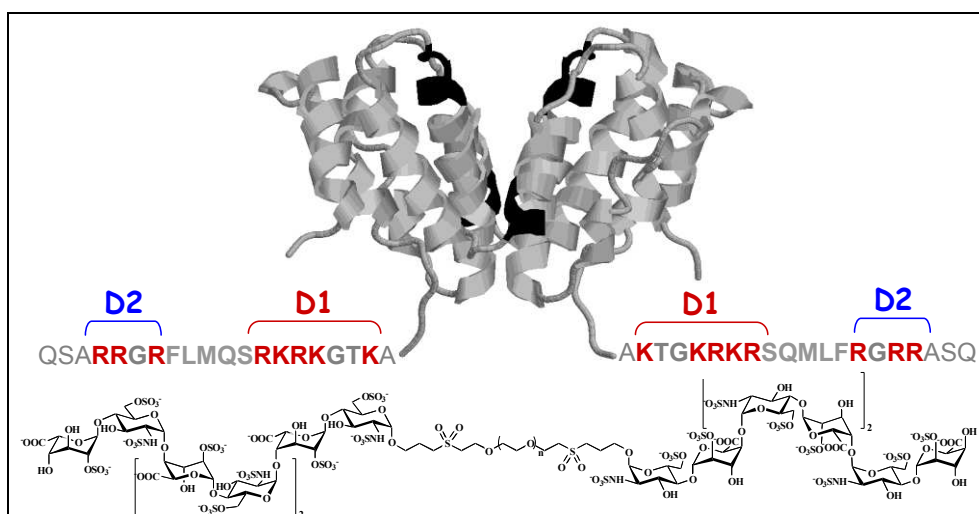


Figure 104 : Structure du mime du site d'interaction des HS pour l'IFN γ en interaction avec ce dernier.
D'après Sarrazin *et al.*, 2005 [320].

De plus, la détermination des éléments structuraux essentiels pour l'interaction de l'IFN γ avec les HS peut également aboutir à une meilleure compréhension de cette interaction et des effets qu'elle induit. Elle pourra également confirmer les résultats obtenus concernant les sites d'interaction respectifs de l'IFN γ et des HS décrit dans les parties précédentes du manuscrit. Une manière optimale pour déterminer les éléments structuraux clés pour l'interaction de l'IFN γ avec les HS est l'élucidation de la structure tri-dimensionnelle de ce complexe au

niveau atomique. C'est pourquoi nous avons tenté de résoudre la structure du complexe de l'IFN γ avec des oligosaccharides d'Hp par cristallographie aux rayons X.

III.1. Difficultés de la cristallisation d'un complexe protéine - HS

Le processus de cristallisation sera expliqué en détail dans le chapitre de matériels et méthodes. A ce jour, de nombreuses protéines ont été cristallisées et leurs structures résolues. Ceci est illustré par le nombre de structures, résolues par cristallographie aux rayons X, déposées à la banque de donnée RCSB PDB [412]. Cependant, la résolution des structures des complexes protéines:oligosaccharides de type HS ou Hp reste très limitée [413]. Tout d'abord, nous allons nous intéresser aux raisons qui rendent la cristallisation de l'IFN γ entier difficile. Puis nous détaillerons celles rendant la cristallisation de ces complexes compliquée.

III.1.a. Difficultés côté de l'IFN γ

Bien que la formation d'un cristal soit aléatoire, certains facteurs sont connus pour promouvoir la cristallisation. On pourra notamment citer l'homogénéité de la préparation et la stabilité structurale de la protéine. L'analyse par spectrométrie de masse et le dosage d'AA nous assure que la qualité de la préparation d'IFN γ , employé dans les essais de cristallisation, est bonne. Le caractère structuré de l'IFN γ , quant à lui, a été prédit par une simulation du désordre par le logiciel IUPred et est représentée sur la figure 105 [359-361]. Elle indique que la partie C-terminale de l'IFN γ est fortement désordonnée. C'est pour cette raison que cette partie est soit non visible soit non inclus dans la protéine cristallisée pour toutes les structures de l'IFN γ publiées à ce jour [36, 38, 363-365]. En effet, la structure de l'IFN γ n'est résolue que pour les 126 premiers résidus.

Néanmoins, une solution existe consistant à la co-cristallisation de la protéine avec un ligand qui stabiliserait la partie désordonnée de la protéine [414]. Nous postulons que la partie désordonnée de l'IFN γ , c'est-à-dire le domaine C-terminal, pourrait être stabilisée par l'interaction avec des HS ou des oligosaccharides d'Hp. Ainsi, par l'interaction de l'IFN γ avec ces oligosaccharides nous espérons favoriser la cristallisation et résoudre la structure de l'IFN γ entier.

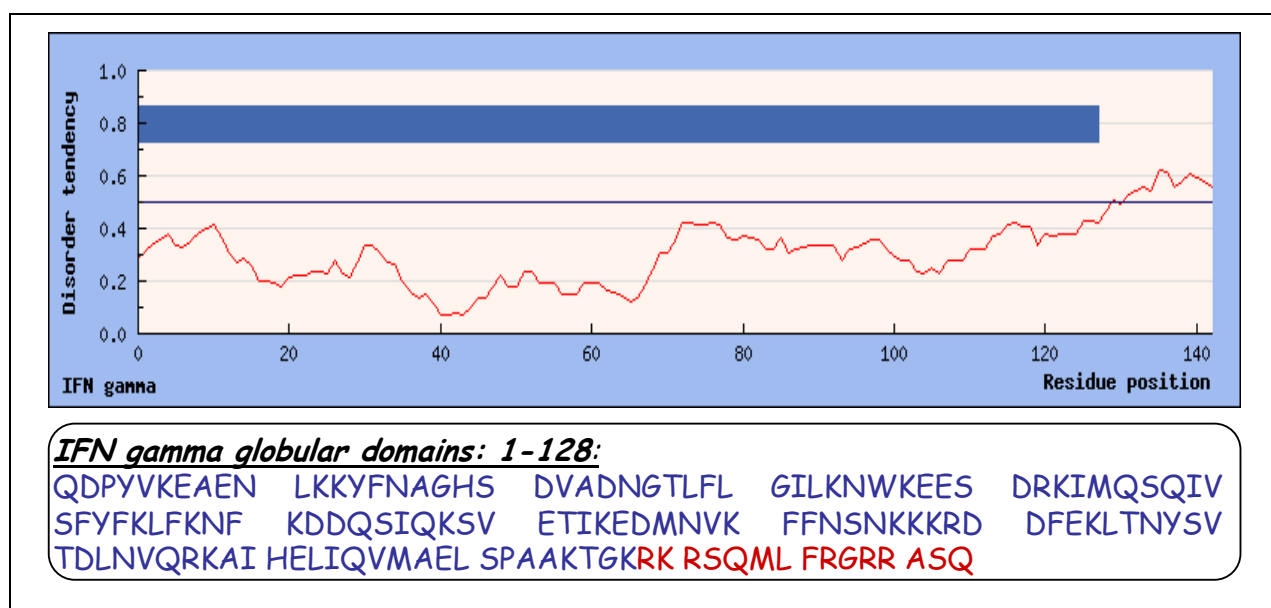


Figure 105 : Prédiction du désordre dans la structure de l'IFN γ .

Le graphique représente le désordre probable de la protéine (en ordonnée) en fonction des acides aminés (abscisses), estimé par le logiciel iupred [361]. La bande en bleu foncé indique quels sont les résidus d'IFN γ qui seraient préférentiellement situés dans un domaine globulaire structuré. Ceci est reporté en dessous du graphique, avec les AA appartenant à une région stable en bleu et ceux qui appartiendraient plutôt à une région désordonnée en rouge. Ainsi, L'IFN γ est composé d'une région structurée, entre les résidus 1 et 128 suivi d'un domaine C-terminal qui est non structuré.

III.1.b. Difficultés côté des HS

Du côté des HS, le problème de cristallisation se complique encore plus. Non seulement la préparation d'un oligosaccharide de type Hp de façon pure et homogène est extrêmement compliquée et laborieuse. Mais en prime, la formation des complexes IFN γ :HS/Hp uniformes capables de s'organiser en cristal semble très incertaine. En effet, les interactions protéine-HS/Hp sont généralement basées sur des forces ioniques tolérant une certaine variabilité du site d'interaction. Ceci génère de l'hétérogénéité dans l'échantillon [40]. D'autre part, les oligosaccharides d'Hp utilisés sont relativement flexibles. Malgré une conformation allongée, du fait de la présence de nombreux groupements sulfates, une flexibilité de la chaîne existe grâce à plusieurs conformations stables des glucosamines ou hexosamines et aux différentes configurations que la liaison, entre ces glucosamines et les acides iduroniques, peut adopter [187]. Afin de promouvoir la formation de cristaux, nous avons donc choisi d'utiliser des dp4, dp6 et dp8 issus de la synthèse chimique puisqu'ils sont parfaitement homogènes.

III.1.c. Structures des complexes protéine-GAG connues aujourd'hui

Aujourd'hui, seule la structure de quelques complexes entre des protéines et des oligosaccharides, de type Hp à masse moléculaire réduite, est résolue. En effet, un décasaccharide est le plus grand fragment oligosaccharidique cristallisé à ce jour. Les protéines, pour lesquelles la structure, en complexe avec les oligosaccharides, est résolue, sont très diverses. On peut noter celle de l'antithrombine III en complexe avec le pentasaccharide spécifique - ceci est le premier complexe qui a été cristallisé - [291], celle d'une annexine avec un tetrasaccharide d'Hp - où des ions calcium jouent un rôle important - [415]. Ainsi que celles de protéines virales comme celle du virus de la fièvre aphteuse en complexe avec un pentasaccharide issu d'Hp [416]. Enfin la structure de deux enzymes, une héparinase [417] et une sulfotransférase [418], en complexe avec leur substrat a également été élucidée.

Ces structures offrent de nombreuses informations quant aux éléments importants pour la formation du complexe. Ainsi, la longueur des fragments d'HS/Hp et leurs caractéristiques essentielles, comme leurs groupements sulfates et leurs épimérisations, peuvent être identifiées. Les AA essentiels dans l'interaction sont également identifiés ainsi que les forces contribuant à la formation du complexe. Il a ainsi été démontré que les forces ioniques forment le pilier de la stabilité du complexe mais que d'autres forces telles que les forces Van der Waals, les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes jouent un rôle non négligeable [240, 386, 395].

III.2. La cristallogénèse du complexe IFN γ :oligosaccharides de type Hp

III.2.a. La formation du complexe

Nous avons souhaité cristalliser l'IFN γ en interaction avec des oligosaccharides de synthèse de type Hp. Trois oligosaccharides différents ont été utilisés: un dp4, un dp6 et un dp8. Ils sont tous complètement sulfatés, leur structure est représentée sur la figure 106. Des essais d'interaction de l'IFN γ avec ces oligosaccharides doivent être réalisés pour déterminer les conditions dans lesquelles le complexe reste soluble. Effectivement, la formation de précipités, état dans lequel les molécules sont organisées de façon hétérogène, doit être évitée pour la cristallogénèse. Cependant, aux concentrations élevées de ligand et de protéine, nécessaire pour la cristallogénèse, la formation d'agrégats est favorisée. De plus, il est possible que les oligosaccharides interagissent avec plus d'une molécule d'IFN γ formant ainsi des ponts entre les différentes molécules d'IFN γ . Ceci provoque l'agrégation de ce dernier.

Dans la littérature, la concentration pour cristalliser l'IFN γ varie entre 4 mg/mL et 11 mg/mL [36, 38, 363-365]. C'est pourquoi, nous avons décidé d'employer une concentration d'IFN γ intermédiaire de 7 mg/mL. Afin de s'assurer que la majorité de l'IFN γ interagit avec les oligosaccharides sans pour autant favoriser la formation d'agrégats, le rapport molaire IFN γ :oligosaccharide a été fixé à 1:1,2. Les premiers essais d'interactions ont été réalisés avec de l'Hp dépolymérisée qui est une alternative moins précieuse et moins coûteuse que les oligosaccharides de synthèse. L'ajout d'une solution concentrée d'IFN γ à une solution contenant les oligosaccharides provoque immédiatement leur précipitation. En revanche, l'ajout d'une solution concentrée de dp4 ou de dp6 à une solution contenant de l'IFN γ , n'a pas provoqué leur agrégation. La solution contenant le complexe reste soluble même 72 h plus tard, puisqu'aucun précipité n'a été observé après centrifugation de la solution. Cependant, pour l'interaction de l'IFN γ avec les dp8, lors des derniers ajouts du dp8 à l'IFN γ un précipité blanchâtre s'est formé. La concentration finale du dp8 a dû être diminuée pour ne pas former d'agrégats. Le rapport molaire final IFN γ :dp8 retenu est de 1,25:1 IFN γ :dp8. Dans cette condition la solution contenant le complexe IFN γ :dp8 reste soluble même 72 h après sa formation.

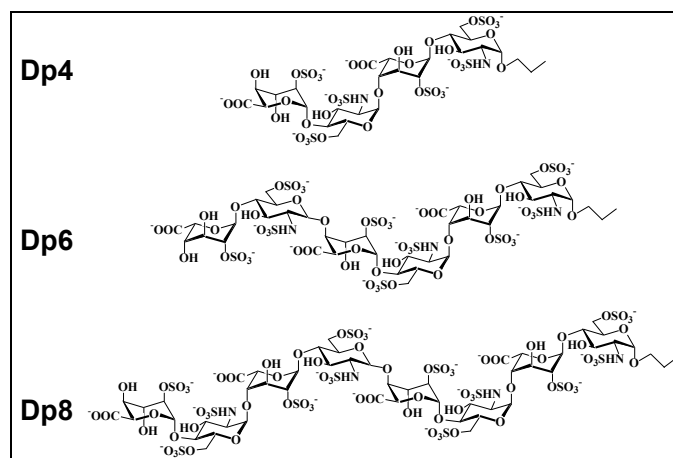


Figure 106 : Structure des oligosaccharides de synthèse employés pour la cristallographie.

Trois oligosaccharides différents sont employés pour la cristallogénèse en complexe avec l'IFN γ : un dp4, un dp6 et un dp8. Ils sont tous totalement sulfatés et produits comme précédemment décrit par Lubineau *et al.*, 2004 [321] et Dilhas *et al.*, 2008 [287].

III.2.b. Le criblage des conditions de cristallisation

Les conditions d'interaction IFN γ :oligosaccharides préalablement déterminées ont été répétées avec des oligosaccharides de synthèse. Ces mélanges ne forment également pas de précipités. Le criblage des conditions menant à la formation des cristaux du mélange, a été effectué sur la plateforme de cristallisation du PSB (Partnership for Structural Biology) où ce processus est entièrement miniaturisé et automatisé. Parmi les 600 conditions testées, une dizaine de conditions pour lesquelles des structures cristallines sont observés semble prometteuse.

III.2.c. L'optimisation de la cristallogénèse

Ces conditions de cristallogénèse ont été affinées en variant le pH et la concentration d'agent précipitant. Après quatre jours, certaines conditions ont déjà formé des microcristaux. Cependant, environ deux semaines ont été nécessaires pour atteindre la taille finale des cristaux. Parmi les 200 nouvelles conditions testées, quatorze ont mené à la formation des cristaux, représentés sur la figure 107. La taille des plus grands cristaux ainsi formés est d'environ 30 μ m. De plus, des cristaux se sont formés pour chacun des ligands oligosaccharidiques dans des conditions variées.

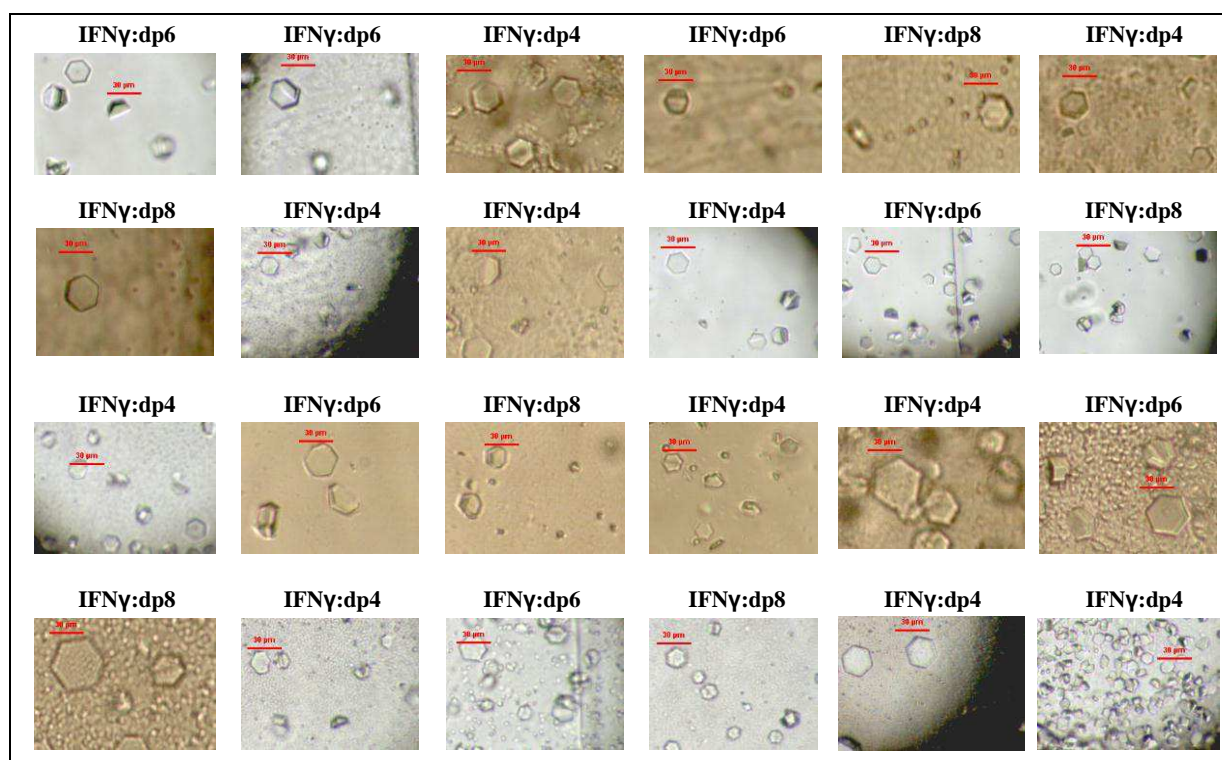


Figure 107 : Cristaux du complexe IFN γ -oligosaccharide.
La barre d'échelle correspond à 30 μ m.

III.3. La diffraction des cristaux du complexe IFN γ :oligosaccharides de type Hp

- La congélation des cristaux

Normalement avant la congélation des cristaux, ceux-ci sont récupérés puis plongés dans une solution cryoprotectrice. Nous n'avons pas pu procéder de cette manière puisque les cristaux étaient trop petits. En conséquence, nous avons ajouté, à la goutte contenant les cristaux, la solution cryoprotectrice avant de récupérer le cristal. La solution cryoprotectrice est composée de la même solution d'agent précipitant que celui présent lors de la cristallogénèse et d'un cryoprotectant, le PEG 400 à 30 %.

- La diffraction des cristaux

Vingt cristaux différents ont été soumis aux rayons X de la ligne ID29 du synchrotron de l'ESRF. La plupart des cristaux récupérés ne diffractent pas ou à très faible résolution (> 12 Å). Un seul cristal diffracte avec une résolution maximale de 7,64 Å. Avec le cliché de diffraction de ce cristal, on commence à apercevoir la structure cristalline hexagonale. Pour ce cristal seulement, deux clichés de diffraction, représentés sur la figure 108 au milieu et à droite, ont pu être indexés. Cependant, nous pouvons observer sur l'image du cristal récupéré et congelé, représenté sur la figure 108 à gauche, que celui-ci a été abîmé par la congélation. Au vu du cliché de diffraction, nous pouvons malgré tout confirmer que le cristal obtenu est celui d'une protéine et non d'un sel.

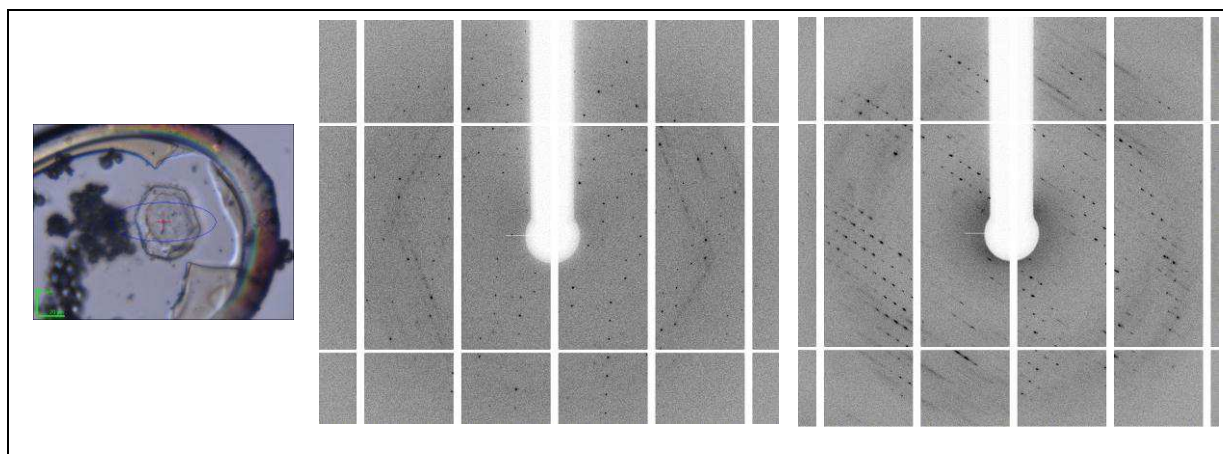


Figure 108 : Clichés de diffraction du cristal diffractant avec une résolution maximale de 7,64 Å.

A gauche : Photo du cristal récupéré et congelé. La croix rouge indique la position ciblée par le faisceau du rayon X, les lignes vertes correspondent à une longueur de 20 μm . Au milieu et à droite : Cliché de diffraction pour le cristal présenté à gauche.

Du fait de la faible résolution du cristal, très peu d'informations peuvent en être déduites. Néanmoins, le groupe d'espace, représentant la symétrie présente dans le cristal, a pu être calculé et est trigonale type P3. Les dimensions de la maille, de 138 Å par 138 Å par 158 Å,

ont également pu être déterminées. Cependant, ce cliché de diffraction ne permet pas de prouver s'il s'agit d'un cristal du complexe ou non, ni qu'il s'agit de l'IFN γ entier. Néanmoins, l'IFN γ seul ne cristallise pas dans ces conditions suggérant que le cristal obtenu est bien celui d'un complexe. De plus, la quantité de protéine, et éventuellement du dp4 présent, contenu dans le cristal (estimé à 41 fmoles), est trop faible pour analyser le contenu du cristal par spectrométrie de masse ou par SDS-PAGE.

Finalement, nous avons estimé le nombre de dimères de l'IFN γ dans une maille par le « Matthews Probability Calculator » [370-371]. Ce programme calcule la probabilité de retrouver un certain nombre de protéines par maille élémentaire basé sur le coefficient de Matthews (V_m) et la teneur en solvant (V_s). Le coefficient de Matthews ($\text{\AA}^3/\text{Da}$) représente le volume de cristal (\AA^3) par unité de masse moléculaire d'une protéine (Da). Elle doit être comprise entre 1,66 et 4 correspondant respectivement à 30% et 75% de solvant. L'inspection de plus de 11 000 structures cristallographiques a démontré qu'une plus haute densité de protéine et une teneur en solvant plus basse corrèle avec une résolution plus élevée. Ainsi avec seule donnée la masse moléculaire de la protéine et les dimensions de la maille, le « Matthews Probability Calculator » calcule la probabilité de retrouver un certain nombre de protéine par maille.

D'après la résolution du cristal, il est probable que 4 à 8 dimères de l'IFN γ soient présents dans la maille (figure 109). Il est possible que l'IFN γ , ou le complexe, cristallise avec autant de molécules d'IFN γ par maille. Cependant, il est plus plausible que le dp4 interagisse avec plus d'un dimère d'IFN γ et que des réseaux soient ainsi formés. La basse résolution peut alors provenir du fait que ces réseaux ne soient pas totalement homogènes.

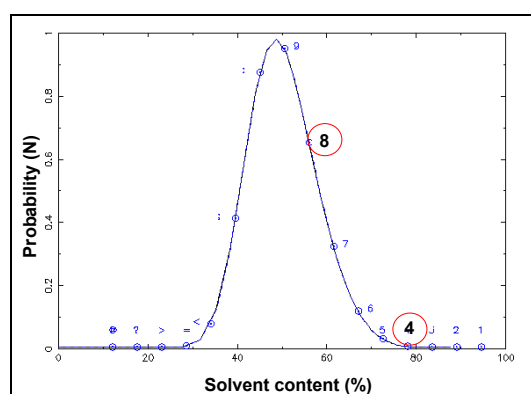


Figure 109 : Calcul du nombre de dimères plausibles par maille.

Le nombre de dimères d'IFN γ par maille cristalline a été calculé *via* le « Matthews Probability Calculator ». Les paramètres utilisés sont les dimensions de la maille 138 \AA - 138 \AA - 158 \AA , un angle γ de 120°C et la masse moléculaire de 35 304 Da. D'après la résolution, il est fortement possible que la maille contienne entre 4 et 8 dimères d'IFN γ .

III.4. Conclusion

L'extrémité C-terminale de l'IFN γ est essentielle pour son activité. C'est pour cette raison que nous avons essayé de déterminer sa structure par cristallographie aux rayons X. Cependant, dans les structures résolues de l'IFN γ , cette partie est soit non visible, soit non inclus dans l'IFN γ cristallisé du fait de la flexibilité de cette région [36, 38, 363-365]. Nous avons alors supposé que l'interaction de l'IFN γ avec les oligosaccharides de type Hp stabilise sa structure et favorise ainsi la cristallisation du complexe [414].

Après affinement des premières conditions prometteuses de cristallogénèse, compatibles avec la formation du complexe, l'affinement nous a permis d'obtenir des cristaux avec diverses conditions. Malgré des différences de conditions de cristallisation, la forme macroscopique des cristaux est très similaire. Cependant, la diffraction des cristaux est médiocre avec une résolution maximale de 7,64 Å. Nous pouvons espérer améliorer la diffraction des cristaux par différentes manières : (1) par l'optimisation des cryoprotectants [419], (2) par l'ajout d'adjuvants de cristallisation connus pour augmenter la qualité et la taille des cristaux obtenus [420-421], (3) en congelant plus rapidement des cristaux pour éviter la dégradation de l'IFN γ (4) par cristallisation en goutte suspendue où les cristaux sont plus faciles à récupérer et le volume de la goutte peut être augmenté ce qui peut accroître la taille des cristaux. En augmentant la taille de cristaux, on pourra caractériser sa composition et savoir si la protéine est non dégradée, et si les oligosaccharides sont présents dans le complexe. Si ces essais n'étaient pas fructueux, on pourrait essayer de résoudre la dynamique du complexe par RMN employant de l'IFN γ marqué ^{13}C et ^{15}N ainsi que du dp8 marqué au ^{13}C [422].

Si la structure du complexe IFN γ :oligosaccharide était obtenue, nous pourrions en déduire les forces d'interactions, confirmer les AA d'IFN γ impliqués et déterminer les éléments structuraux oligosaccharidiques intervenant dans l'interaction. Il serait aussi intéressant de cristalliser l'IFN γ en complexe avec divers oligosaccharides contenant seulement certains groupements sulfates. De cette manière on pourrait déterminer si les oligosaccharides s'adaptent pour ajuster l'orientation de leurs groupements sulfates aux positions des AA basiques d'IFN γ comme le propose le modèle d'ajustement induit [423].

DISCUSSION GENERALE

L'IFN γ , découverte il y a une cinquantaine d'années [11, 15, 32], est identifié à ce jour comme une cytokine clé du système immunitaire [88]. En effet, l'IFN γ est essentiel pour la mise en place de la réponse immunitaire innée autant qu'adaptive et intervient aussi dans les mécanismes de défense contre des infections virales, bactériennes et parasitaires. Le dysfonctionnement de son expression est aussi lié à diverses maladies auto-immunes ou inflammatoires [114] ainsi qu'au cancer [119]. L'IFN γ transmet ses signaux par interaction avec l'IFN γ R, ubiquitairement présent sur la surface cellulaire [42-43]. Il active ainsi, en particulier, la voie de signalisation JAK-STAT menant à l'expression des gènes contenant les GAS [424].

Cependant, depuis une vingtaine d'années, il a été démontré que l'IFN γ interagissait également avec une autre molécule abondamment présente sur la surface cellulaire : les HS [87]. Les HS sont des GAG hautement sulfatés, associés à divers processus biologiques, notamment dans des processus de contact entre la cellule et son environnement [185, 197]. On peut noter qu'ils sont essentiels au contrôle de la prolifération cellulaire, l'adhésion ou la migration cellulaire, la réponse immunitaire, la formation des gradients chimiotactiques, la régulation de diverses cascades enzymatiques ainsi que dans l'attachement des pathogènes à leurs cibles cellulaires [185, 197]. Ces fonctions dépendent de sa capacité à lier de nombreuses protéines, ce qu'ils font par le biais de structures oligosaccharidiques variables [174, 425].

Concernant l'IFN γ , les HS le concentrent rapidement et localement sur la surface cellulaire [277, 323-324]. Cette interaction régule l'activité de l'IFN γ par un mécanisme de protection partielle de son extrémité C-terminale contre la protéolyse [277], permettant de conserver intact le domaine D1 et de cliver le domaine D2. La perte de ce dernier augmente l'activité de la cytokine [277], par un mécanisme qui n'est pas encore compris à ce jour. En revanche, il est certain que l'augmentation de l'activité n'est pas liée à une augmentation de l'affinité du complexe IFN γ :HS pour l'IFN γ R par rapport à l'IFN γ seul puisque l'IFN γ ne peut pas à la fois lier l'IFN γ R et les HS [80].

Ce système de régulation est alors bien différent de ceux par lesquels les HS interviennent dans l'activité des FGF [301, 426] ou de l'ATIII [247, 426]. En effet, contrairement à l'IFN γ , l'interaction des HS avec les FGF facilite ou stabilise la formation d'un complexe entre ces derniers et leur récepteur (FGFR). Ceci stabilise ou favorise également la dimérisation du

complexe FGF:FGFR, ce qui est nécessaire pour la signalisation cellulaire. Dans ce cas, les HS augmentent l'activité du FGF en favorisant la formation de complexes de signalisation actifs. Dans le cas de l'ATIII, l'Hp induit un changement conformationnel nécessaire à l'activation de ce dernier qui peut ainsi inhiber le Facteur Xa ou la thrombine.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'importance des domaines basiques, D1 et D2 de l'extrémité C-terminale de l'IFN γ , pour l'interaction avec les HS et avec l'IFN γ R. Le domaine D1 est important pour l'interaction avec l'IFN γ R, mais le domaine D2 ne semble pas impliqué. Concernant l'interaction de l'IFN γ avec les HS, le domaine D2 est important et le domaine D1 est quant à lui essentiel. Il est surprenant de constater une telle différence d'importance des deux domaines basiques de l'IFN γ pour l'interaction avec les HS puisqu'ils ont tout deux une charge nette positive et contiennent tous les deux des résidus d'arginine. Toutefois, la charge globale du domaine D1 est plus élevée que celle du domaine D2, et ce domaine contient non seulement des résidus d'arginine mais également des résidus de lysine comme résidus basiques. Néanmoins, une telle distinction d'affinité pour les HS entre deux domaines basiques qui se trouvent à proximité l'un de l'autre n'a jamais été constatée auparavant pour une interaction HS-protéine. De plus, une étude, réalisée avec des peptides synthétiques, a démontrée que les résidus d'arginines contribueraient 2,5 fois plus que les résidus de lysine à l'affinité pour les HS [427]. Malgré le fait qu'il y ait plus de résidus d'arginine dans le domaine D2 que dans le domaine D1, ce dernier est plus important que le domaine D2 pour l'interaction de l'IFN γ avec les HS.

Une autre particularité du site d'interaction de l'IFN γ avec les HS est sa flexibilité [40]. Le domaine C-terminal de l'IFN γ est effectivement non replié et appartient aux séquences protéiques dites intrinsèquement désordonnées. La fréquence et l'importance de ces zones désordonnées deviennent de plus en plus reconnues [428-430]. Elles sont généralement caractérisées par un enrichissement en certains AA, dont des résidus d'arginine, des résidus de lysine et des résidus de glutamine. Douze des vingt AA du domaine C-terminal de l'IFN γ correspondent à ces AA. Ces séquences sont notamment associées à des reconnaissances moléculaires multiples par rapport aux zones structurées. De ce fait, il est compréhensible que ce domaine de la cytokine permette l'absorption rapide de l'IFN γ à la surface cellulaire après sa sécrétion et soit impliqué dans la reconnaissance de deux ligands différents. Une autre protéine, qui contient également un tel site d'interaction pour les HS, est une isoforme de la chimiokine CXCL12 appelée CXCL12 γ [431-432]. Effectivement, un site d'interaction supplémentaire pour les HS, par rapport à celui présent dans CXCL12 α , est retrouvé dans son

extrémité C-terminale, qui est également intrinsèquement désordonnée [432-433]. La présence de ce site d'interaction augmente l'affinité pour les HS d'un facteur cent [431]. Ces caractéristiques sont très différentes de celles que l'on trouve dans les sites d'interaction du FGF [257] ou de l'ATIII [246]. Ces sites d'interaction se trouvent effectivement dans des parties repliées et hautement structurées de la protéine. Dans le cas de FGF, ce site d'interaction forme d'ailleurs même un sillon bien défini.

D'après nos tests d'interaction par SPR, nous supposons que le domaine D2 de l'IFN γ n'interagit avec les HS que par des interactions non spécifiques et relativement faibles, contrairement au domaine D1 qui interagit fortement avec les HS et forme un complexe stable. De cette manière, dans le complexe IFN γ :HS, ce domaine D2 ne sera pas protégé contre une éventuelle activité protéolytique, comme ceci a été par ailleurs démontré [372]. Cette hypothèse est également soutenue par les expériences de microcalorimétrie, où nous avons démontré que peu de forces d'interaction spécifiques sont présentes entre le domaine D2 de l'IFN γ et les HS. En revanche, les tests d'interactions et d'activités antivirales que nous avons réalisés ne permettent pas pour l'instant une meilleure compréhension du mécanisme avec lequel l'IFN γ , lié aux HS, se « transloque » vers l'IFN γ R. Ils n'expliquent pas non plus comment en l'absence du domaine D2, la signalisation de l'IFN γ est exaltée. En effet, nos mesures d'interaction par SPR indiquent que la perte du domaine D2 ne modifie pas significativement l'affinité de l'IFN γ pour l'IFN γ R. En revanche, ce résultat n'est pas en accord avec celui de Sadir *et al.* [80] qui constatent que la perte du domaine D2 double l'affinité de l'IFN γ pour son récepteur. Néanmoins, même si l'affinité de l'IFN γ pour son récepteur est doublée par la perte du domaine D2, ceci n'explique pas une augmentation de son activité d'un facteur 6 [277]. D'autres expériences seront nécessaires pour comprendre le mécanisme d'augmentation d'activité de la cytokine par perte du domaine D2 et le mécanisme lui permettant d'interagir avec l'IFN γ R, à partir de son site de liaison initiale, les HS.

Un modèle d'interaction IFN γ :HS a été proposé par Lortat-Jacob *et al.* [304]. Nous avons souhaité confirmer ce modèle en mesurant la stœchiométrie du complexe par microcalorimétrie. Cependant, plusieurs conformations de ce complexe IFN γ :HS semblent co-exister. Un complexe où deux dp8 interagissent par dimère de l'IFN γ , comme proposé initialement [304] puis un, où un dp8 interagit par dimère de l'IFN γ . Nous supposons pour cette dernière conformation que les extrémités C-terminales de l'IFN γ se referment sur un dp8 unique. Nous avons analysé la thermodynamique de ce complexe, qui s'avère particulière pour une interaction protéine:HS. En effet, elle est caractérisée par une entropie défavorable

potentiellement du fait de la flexibilité du domaine C-terminal de l'IFN γ qui se rigidifie ou se structure lors l'interaction avec les HS. Néanmoins, l'effet électrolyte [392] limite probablement cette contribution défavorable de l'entropie. Dans la plupart des interactions protéine:HS [280, 340, 386-388, 434], l'entropie est favorable puisque le site d'interaction des protéines pour les HS est déjà structuré avant l'interaction avec ces derniers. La perte d'entropie par la rigidification de la protéine est alors moins importante et l'effet électrolyte est le plus important, provoquant une entropie favorable pour ces interactions. Dans la situation où les deux conformations du complexe IFN γ :HS coexistent, la thermodynamique du complexe IFN γ :dp8 (de ratio 1:2, où deux dp8 interagissent par dimère de l'IFN γ), a été déterminée. Elle est en revanche caractéristique des interactions protéine:HS, c'est-à-dire caractérisée par une entropie et une enthalpie favorable. Cependant, l'enthalpie de l'interaction est relativement faible indiquant que peu de forces d'interaction entre les dp8 et l'IFN γ existent. Il est difficile de savoir si ces deux complexes existent *in vivo* où s'ils sont liés aux conditions expérimentales (ordre d'introduction des réactifs). Nous supposons que le modèle d'interaction proposé par Lortat-Jacob *et al.* [304] est celui majoritairement retrouvé *in vivo*, puisque dans cette situation la concentration de l'IFN γ doit être bien moindre que celle des HS. Néanmoins, localement l'autre complexe avec les extrémités C-terminales refermées peut exister.

Pendant ce projet de thèse, nous avons également étudié les critères de spécificité de séquences des HS pour l'interaction avec l'IFN γ . En effet, en dépit du fait que de nombreuses protéines soient connues pour interagir avec les HS, les prérequis structuraux restent peu élucidés du côté oligosaccharidique [405, 413, 433]. Ceci est majoritairement dues aux difficultés techniques de purification de séquences homogènes d'HS et de leur caractérisation ou séquençage. Dans ce contexte, nous avons analysé une banque de dp8 par MALDI-MS, que nous avons préalablement préparée à partir d'HS naturel [396]. Une telle caractérisation apporte une indication quant au nombre de groupements sulfates et de groupements acétyles présents dans chaque fraction. Cependant, ce type d'analyse qui donne une composition globale, ne permet pas de déterminer la position des groupements sulfates ou acétyles.

Malgré les difficultés de caractérisation structurale des HS, la spécificité des séquences oligosaccharidiques liant certaines protéines a tout de même été élucidée. Dans le cas de l'ATIII [213, 313] une séquence particulière d'HS est nécessaire pour interagir avec la protéine. Au contraire, dans l'interaction du FGF1, [301] avec les HS, certains groupements sulfates sont essentiels pour l'interaction mais une variabilité de la séquence d'HS liant le

FGF1 est acceptée. Pour l'interaction de l'IFN γ , il a été démontré que le site d'interaction est composé de deux dp8 de type NS maintenu à une certaine distance grâce à un domaine interne de type NA [304]. Ce système d'interaction par multiple domaine NS est également actif vis-à-vis de VEGF-A₁₆₅, IL-8, MIP- α , endostatine et RANTES [249, 307-308].

La longueur de l'espacement entre les domaines NS est un premier prérequis structural pour que l'HS puisse interagir avec l'IFN γ . Cependant, aucune information n'est à ce jour connue quant à l'importance des positions des groupements sulfates ou acétyles sur les HS pour lier l'IFN γ . Grâce à l'utilisation d'une banque de dp8 contenant des fractions ayant un degré de sulfatation croissant, nous avons suggéré qu'un profil de sulfatation particulier est à la base de la haute affinité des HS pour l'IFN γ . En revanche, le séquençage de ces fractions reste nécessaire afin d'identifier précisément les éléments structuraux essentiels pour que les dp8 puissent interagir avec l'IFN γ . Nous disposons désormais d'une quantité suffisante de fractions de dp8 pour effectuer une telle analyse.

Etant donné que l'interaction de l'IFN γ avec les HS modifie l'activité de la cytokine [277, 435] et qu'une certaine spécificité de séquence d'HS liant l'IFN γ semble présente, nous pouvons supposer que selon le profil d'HS exprimé à la surface cellulaire, l'activité de l'IFN γ puisse être modifiée. En effet, il a été démontré que l'expression d'HS est hautement régulée et que différentes structures d'HS sont exprimées selon le type de cellules [436-437] ou son stade de développement [438-439].

Durant la dernière partie de ce projet, nous avons tenté de résoudre la structure du complexe IFN γ :HS. Une fois la structure de ce complexe acquise, nous pourrions caractériser cette interaction au niveau moléculaire [413]. En effet, les caractéristiques structurales des HS et des AA de la protéine impliqués dans l'interaction peuvent être identifiées si la structure du complexe est obtenue avec une résolution suffisante. De plus, les types de contacts (Van der Waals, liaisons hydrogènes, électrostatiques,...) entre les deux molécules peuvent en être déduites [440-441]. Ces données devraient nous permettre de mieux définir l'interface IFN γ :HS, et aider à la conception d'une molécule inhibitrice de l'activité de l'IFN γ . Les interactions protéine-HS sont, effectivement, de plus en plus ciblées pour la conception éventuelle de nouveaux médicaments [442-444].

Il est important de rappeler néanmoins que de nombreuses protéines lient les HS. Une molécule, ciblant l'interface protéine:HS doit alors être spécifique afin d'éviter les modifications d'activité d'autres protéines. C'est pour cette raison qu'une connaissance atomique de l'interaction protéine:HS doit être acquise. Cependant, le nombre de structures de

complexes protéine:HS résolues reste restreint à ce jour [413] limitant la conception de tels médicaments. La synthèse d'un médicament de type HS, basée sur la séquence oligosaccharidique reconnue par l'ATIII est malgré tout marquante et largement utilisée comme anticoagulant. Il s'agit d'un pentasaccharide, Fondaparinux (Arixtra[®], GlaxoSmithKline[®]) [213, 445], active spécifiquement l'ATIII inhibant ainsi facteur Xa [446-448]. On peut également noter la synthèse d'analogues chimiques des HS inhibant l'activité d'un FGF ou d'un VEGF particulier [449].

Un tel mime du site d'interaction de l'IFN γ [320-321] a déjà été conçu et est basé sur le modèle SAS [304]. Cette molécule, appelée 2O₁₀, contient deux dp8 entièrement sulfatés maintenus à une certaine distance par un bras espaceur de type PEG. Cependant, puisque ces dp8 sont entièrement sulfatés, nous supposons que la spécificité de cette molécule pour l'IFN γ est relativement basse. Elle n'est donc pas utilisable en tant que telle pour inhiber l'activité de l'IFN γ . C'est pour cette raison que nous avons aussi souhaité cristalliser le complexe IFN γ :HS. Les conditions de cristallisation de ce complexe sont déjà identifiées mais doivent être optimisées pour augmenter la résolution du cristal. De plus, à cause de la taille réduite des cristaux nous n'avons pas encore pu nous assurer qu'il s'agit du complexe IFN γ :HS qui est cristallisé et non de l'IFN γ seul.

L'analyse biochimique de cette interaction ainsi que la résolution de sa structure reste désormais indispensable pour l'amélioration de la molécule 2O₁₀ quant à son affinité et sa spécificité pour l'IFN γ . D'autre part, il faut noter que la synthèse chimique d'un tel mime d'HS reste laborieuse et difficile à grande échelle. C'est pourquoi des méthodes de synthèse doivent encore être adaptées à la production de masse d'une telle molécule [321]. Par ailleurs, la connaissance de la thermodynamique de l'interaction IFN γ :HS peut également être employée dans la conception d'un tel mime puisque ces informations spécifient les forces motrices de l'interaction [450]. Par exemple, le fait que l'interaction soit caractérisée par une contribution défavorable ou très peu favorable (dépendant du sens de la titration) de l'entropie peut aider à la conception d'un meilleur médicament. En effet, si nous concevons un mime moins flexible, nous pouvons augmenter son affinité pour l'IFN γ en diminuant la perte de l'entropie lors de l'interaction. En revanche, la plupart des médicaments conçus aujourd'hui par « drug design » [451-452] sont majoritairement basés sur une amélioration de l'enthalpie et non sur une amélioration de l'entropie de l'interaction.

Ce projet de thèse s'inscrit donc dans un contexte générale de la compréhension du mécanisme de régulation des cytokines par les HS. En effet, ces interactions sont de mieux en

mieux comprises. D'un point de vue fonctionnel, ces interactions augmentent l'action des cytokines par : (1) la concentration des cytokines dans des zones spécifiques (2) l'activation des cytokines *via* l'induction de changements de leur conformation parfois caractérisés par une oligomérisation, (3) la protection contre la dégradation des cytokines. De plus, dans certains cas, il a été démontré que les séquences d'HS liant les cytokines sont spécifiques, laissant naître l'espoir que des médicaments basés sur ce concept peuvent bientôt voir le jour.

REFERENCES

1. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
2. Wheelock, E.F., *Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin*. Science, 1965. **149**(3681): p. 310-1.
3. Falcoff, R., *Some properties of virus and immune-induced human lymphocyte interferons*. J Gen Virol, 1972. **16**(2): p. 251-3.
4. Youngner, J.S. and S.B. Salvin, *Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity*. J Immunol, 1973. **111**(6): p. 1914-22.
5. *Interferon nomenclature*. J Immunol, 1980. **125**(5): p. 2353.
6. Langford, M.P., et al., *Large-scale production and physicochemical characterization of human immune interferon*. Infect Immun, 1979. **26**(1): p. 36-41.
7. de Ley, M., et al., *Interferon induced in human leukocytes by mitogens: production, partial purification and characterization*. Eur J Immunol, 1980. **10**(11): p. 877-83.
8. Yip, Y.K., et al., *Partial purification and characterization of human gamma (immune) interferon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(3): p. 1601-5.
9. Gray, P.W. and D.V. Goeddel, *Structure of the human immune interferon gene*. Nature, 1982. **298**(5877): p. 859-63.
10. Devos, R., et al., *Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(8): p. 2487-501.
11. Billiau, A. and P. Matthys, *Interferon-gamma: a historical perspective*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 97-113.
12. Dumonde, D.C., et al., *"Lymphokines": non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation*. Nature, 1969. **224**(5214): p. 38-42.
13. Hillyer, P., et al., *Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent*. Immunol Cell Biol, 2012.
14. George, P.M., et al., *Pharmacology and therapeutic potential of interferons*. Pharmacol Ther, 2012.
15. Billiau, A., *Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(5): p. 381-409.
16. Gottenberg, J.E. and G. Chiocchia, *Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity*. Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 856-71.
17. Igawa, D., M. Sakai, and R. Savan, *An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals*. Mol Immunol, 2006. **43**(7): p. 999-1009.
18. Savan, R., et al., *Structural conservation of interferon gamma among vertebrates*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 115-24.
19. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 41-101.
20. Stetson, D.B., et al., *Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1069-76.
21. Kronenberg, M., *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 877-900.
22. Frucht, D.M., et al., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 556-60.

23. Harris, D.P., et al., *Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 475-82.
24. Billiau, A. and K. Vandenbroeck, *Interferon gamma*. Cytokine reference : a compendium of cytokines and other mediators of host defense, 2001: p. 641-688.
25. Wilson, C.B. and M. Merckenschlager, *Chromatin structure and gene regulation in T cell development and function*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(2): p. 143-51.
26. Khabar, K.S. and H.A. Young, *Post-transcriptional control of the interferon system*. Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 761-9.
27. Mavropoulos, A., et al., *Stabilization of IFN-gamma mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells*. Blood, 2005. **105**(1): p. 282-8.
28. Muljo, S.A., et al., *Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 261-9.
29. Bureau, J.F., et al., *The gene coding for interferon-gamma is linked to the D12S335 and D12S313 microsatellites and to the MDM2 gene*. Genomics, 1995. **28**(1): p. 109-12.
30. Derynck, R., et al., *Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(12): p. 3605-15.
31. Naylor, S.L., et al., *Human immune interferon gene is located on chromosome 12*. J Exp Med, 1983. **157**(3): p. 1020-7.
32. Williams, J.G., G.J. Jurkovich, and R.V. Maier, *Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine*. J Surg Res, 1993. **54**(1): p. 79-93.
33. Sareneva, T., et al., *Role of N-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon-gamma*. Biochem J, 1994. **303** (Pt 3): p. 831-40.
34. Kelker, H.C., et al., *Three molecular weight forms of natural human interferon-gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1984. **259**(7): p. 4301-4.
35. Sareneva, T., et al., *Biosynthesis and N-glycosylation of human interferon-gamma. Asn25 and Asn97 differ markedly in how efficiently they are glycosylated and in their oligosaccharide composition*. Eur J Biochem, 1996. **242**(2): p. 191-200.
36. Ealick, S.E., et al., *Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma*. Science, 1991. **252**(5006): p. 698-702.
37. Grzesiek, S., et al., *¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma*. Biochemistry, 1992. **31**(35): p. 8180-90.
38. Thiel, D.J., et al., *Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex*. Structure, 2000. **8**(9): p. 927-36.
39. Walter, M.R., et al., *Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 230-5.
40. Perez Sanchez, H., et al., *Organization of human interferon gamma-heparin complexes from solution properties and hydrodynamics*. Biochemistry, 2006. **45**(44): p. 13227-38.
41. Shankaran, V. and R. Schreiber, *Interferon gamma receptor*. Cytokine Reference, 2000.
42. Farrar, M.A. and R.D. Schreiber, *The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 571-611.
43. Anderson, P., Y.K. Yip, and J. Vilcek, *Specific binding of ¹²⁵I-human interferon-gamma to high affinity receptors on human fibroblasts*. J Biol Chem, 1982. **257**(19): p. 11301-4.

44. Randal, M. and A.A. Kossiakoff, *The structure and activity of a monomeric interferon-gamma:alpha-chain receptor signaling complex*. Structure, 2001. **9**(2): p. 155-63.
45. Randal, M. and A.A. Kossiakoff, *Crystallization and preliminary X-ray analysis of a 1:1 complex between a designed monomeric interferon-gamma and its soluble receptor*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 1057-60.
46. Lundell, D., et al., *The carboxyl-terminal region of human interferon gamma is important for biological activity: mutagenic and NMR analysis*. Protein Eng, 1991. **4**(3): p. 335-41.
47. Griggs, N.D., et al., *The N-terminus and C-terminus of IFN-gamma are binding domains for cloned soluble IFN-gamma receptor*. J Immunol, 1992. **149**(2): p. 517-20.
48. Bernabei, P., et al., *Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(6): p. 950-60.
49. Bach, E.A., et al., *Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1215-8.
50. Sakatsume, M., et al., *The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17528-34.
51. Krause, C.D., et al., *Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(10): p. 805-15.
52. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
53. Sekimoto, T., et al., *Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 7067-77.
54. Subramaniam, P.S., et al., *The COOH-terminal nuclear localization sequence of interferon gamma regulates STAT1 alpha nuclear translocation at an intracellular site*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 15): p. 2771-81.
55. Gough, D.J., et al., *IFNgamma signaling-does it mean JAK-STAT?* Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(5-6): p. 383-94.
56. Gil, M.P., et al., *Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6680-5.
57. Ramana, C.V., et al., *Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling*. Trends Immunol, 2002. **23**(2): p. 96-101.
58. Gough, D.J., et al., *A novel c-Jun-dependent signal transduction pathway necessary for the transcriptional activation of interferon gamma response genes*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 938-46.
59. Hu, J., et al., *ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 287-97.
60. Deb, A., et al., *RNA-dependent protein kinase PKR is required for activation of NF-kappa B by IFN-gamma in a STAT1-independent pathway*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6170-80.
61. Schreiber, R.D. and M.A. Farrar, *The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor*. Gastroenterol Jpn, 1993. **28 Suppl 4**: p. 88-94; discussion 95-6.

62. Song, M.M. and K. Shuai, *The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities.* J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35056-62.
63. Sadir, R., et al., *Caveolae and clathrin-coated vesicles: two possible internalization pathways for IFN-gamma and IFN-gamma receptor.* Cytokine, 2001. **14**(1): p. 19-26.
64. Bader, T. and J. Weitzerbin, *Nuclear accumulation of interferon gamma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 11831-5.
65. Subramaniam, P.S., et al., *The carboxyl terminus of interferon-gamma contains a functional polybasic nuclear localization sequence.* J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 403-7.
66. Subramaniam, P.S., B.A. Torres, and H.M. Johnson, *So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors.* Cytokine, 2001. **15**(4): p. 175-87.
67. Larkin, J., 3rd, et al., *Differential properties of two putative nuclear localization sequences found in the carboxyl-terminus of human ifn-gamma.* J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(6): p. 341-8.
68. Fulcher, A.J., et al., *Interferon gamma is recognised by importin alpha/beta: enhanced nuclear localising and transactivation activities of an interferon gamma mimetic.* FEBS Lett, 2008. **582**(11): p. 1569-74.
69. Larkin, J., 3rd, H.M. Johnson, and P.S. Subramaniam, *Differential nuclear localization of the IFNGR-1 and IFNGR-2 subunits of the IFN-gamma receptor complex following activation by IFN-gamma.* J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(6): p. 565-76.
70. Ahmed, C.M., et al., *The role of IFNgamma nuclear localization sequence in intracellular function.* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 15): p. 3089-98.
71. Green, M.M., et al., *Human IFN gamma receptor cytoplasmic domain: expression and interaction with HuIFN gamma.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(1): p. 170-6.
72. Ahmed, C.M., et al., *Peptide mimetics of gamma interferon possess antiviral properties against vaccinia virus and other viruses in the presence of poxvirus B8R protein.* J Virol, 2005. **79**(9): p. 5632-9.
73. Subramaniam, P.S., et al., *Signal transduction mechanism of a peptide mimetic of interferon-gamma.* Biochemistry, 2004. **43**(18): p. 5445-54.
74. Melen, K., et al., *Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein.* J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 28193-200.
75. Subramaniam, P.S. and H.M. Johnson, *The IFNAR1 subunit of the type I IFN receptor complex contains a functional nuclear localization sequence.* FEBS Lett, 2004. **578**(3): p. 207-10.
76. Rinderknecht, E., B.H. O'Connor, and H. Rodriguez, *Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation.* J Biol Chem, 1984. **259**(11): p. 6790-7.
77. Pan, Y.C., et al., *Structural characterization of human interferon gamma. Heterogeneity of the carboxyl terminus.* Eur J Biochem, 1987. **166**(1): p. 145-9.
78. Nacheva, G., et al., *Human interferon gamma: significance of the C-terminal flexible domain for its biological activity.* Arch Biochem Biophys, 2003. **413**(1): p. 91-8.
79. Döbeli, H., et al., *Role of the carboxy-terminal sequence on the biological activity of human immune interferon (IFN-γ).* Journal of Biotechnology, 1988. **7**(3): p. 199-216.

80. Sadir, R., E. Forest, and H. Lortat-Jacob, *The heparan sulfate binding sequence of interferon-gamma increased the on rate of the interferon-gamma-interferon-gamma receptor complex formation*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 10919-25.
81. Arakawa, T., et al., *Effect of amino-terminal processing by Staphylococcus aureus V-8 protease on activity and structure of recombinant human interferon-gamma*. J Interferon Res, 1990. **10**(3): p. 321-9.
82. Hogrefe, H.H., et al., *Amino terminus is essential to the structural integrity of recombinant human interferon-gamma*. J Biol Chem, 1989. **264**(21): p. 12179-86.
83. Magazine, H.I., et al., *Use of synthetic peptides to identify an N-terminal epitope on mouse gamma interferon that may be involved in function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(4): p. 1237-41.
84. Russell, J.K., et al., *Epitope and functional specificity of monoclonal antibodies to mouse interferon-gamma: the synthetic peptide approach*. J Immunol, 1986. **136**(9): p. 3324-8.
85. Szente, B.E., J.M. Soos, and H.W. Johnson, *The C-terminus of IFN gamma is sufficient for intracellular function*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(3): p. 1645-54.
86. Szente, B.E. and H.M. Johnson, *Binding of IFN gamma and its C-terminal peptide to a cytoplasmic domain of its receptor that is essential for function*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **201**(1): p. 215-21.
87. Lortat-Jacob, H. and J.A. Grimaud, *Interferon-gamma binds to heparan sulfate by a cluster of amino acids located in the C-terminal part of the molecule*. FEBS Lett, 1991. **280**(1): p. 152-4.
88. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
89. Samarajiwa, S.A., et al., *INTERFEROME: the database of interferon regulated genes*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D852-7.
90. Billiau, A., et al., *Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **856**: p. 22-32.
91. Purkerson, J. and P. Isakson, *A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching*. FASEB J, 1992. **6**(14): p. 3245-52.
92. Fruh, K. and Y. Yang, *Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(1): p. 76-81.
93. Reith, W., et al., *The molecular basis of MHC class II deficiency and transcriptional control of MHC class II gene expression*. Microbes Infect, 1999. **1**(11): p. 839-46.
94. Nathan, C.F., et al., *Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity*. J Exp Med, 1983. **158**(3): p. 670-89.
95. Cassatella, M.A., et al., *Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components*. J Biol Chem, 1990. **265**(33): p. 20241-6.
96. Nussler, A.K. and T.R. Billiar, *Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase*. J Leukoc Biol, 1993. **54**(2): p. 171-8.
97. Muller, U., et al., *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1918-21.
98. Pfefferkorn, E.R., *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 908-12.

99. Bosisio, D., et al., *Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3427-31.
100. Xaus, J., et al., *Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 103-13.
101. Binns, R.M., et al., *Active lymphocyte traffic induced in the periphery by cytokines and phytohemagglutinin: three different mechanisms?* Eur J Immunol, 1992. **22**(9): p. 2195-203.
102. Chen, Y., A. Nakane, and T. Minagawa, *Recombinant murine gamma interferon induces enhanced resistance to Listeria monocytogenes infection in neonatal mice*. Infect Immun, 1989. **57**(8): p. 2345-9.
103. Thale, C. and A.F. Kiderlen, *Sources of interferon-gamma (IFN-gamma) in early immune response to Listeria monocytogenes*. Immunobiology, 2005. **210**(9): p. 673-83.
104. Buchmeier, N.A. and R.D. Schreiber, *Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of Listeria monocytogenes infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(21): p. 7404-8.
105. Kagaya, K., K. Watanabe, and Y. Fukazawa, *Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for Salmonella-killing activity*. Infect Immun, 1989. **57**(2): p. 609-15.
106. Nathan, C.F., et al., *Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy*. N Engl J Med, 1986. **315**(1): p. 6-15.
107. Flynn, J.L., et al., *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2249-54.
108. Kamijo, R., et al., *Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1435-40.
109. Haagmans, B.L., et al., *Suppression of rat cytomegalovirus replication by antibodies against gamma interferon*. J Virol, 1994. **68**(4): p. 2305-12.
110. Stanton, G.J., et al., *Nondetectable levels of interferon gamma is a critical host defense during the first day of herpes simplex virus infection*. Microb Pathog, 1987. **3**(3): p. 179-83.
111. Fagundes, C.T., et al., *IFN-gamma production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(12): p. e1449.
112. Skurkovich, S.V., et al., *Immunosuppressive effect of an anti-interferon serum*. Nature, 1974. **247**(442): p. 551-2.
113. Skurkovich, B. and S. Skurkovich, *Anti-interferon-gamma antibodies in the treatment of autoimmune diseases*. Curr Opin Mol Ther, 2003. **5**(1): p. 52-7.
114. Kelchtermans, H., A. Billiau, and P. Matthys, *How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check*. Trends Immunol, 2008. **29**(10): p. 479-86.
115. Hu, X. and L.B. Ivashkiv, *Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases*. Immunity, 2009. **31**(4): p. 539-50.
116. Dighe, A.S., et al., *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
117. Shankaran, V., et al., *IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.

118. Beatty, G.L. and Y. Paterson, *Regulation of tumor growth by IFN-gamma in cancer immunotherapy*. Immunol Res, 2001. **24**(2): p. 201-10.
119. Ikeda, H., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 95-109.
120. George, P.M., et al., *Pharmacology and therapeutic potential of interferons*. Pharmacol Ther, 2012. **135**(1): p. 44-53.
121. Miller, C.H., S.G. Maher, and H.A. Young, *Clinical Use of Interferon-gamma*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1182**: p. 69-79.
122. Marciano, B.E., et al., *Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(5): p. 692-9.
123. Actimmune, <http://www.actimmune.com/>.
124. Key, L.L., Jr., et al., *Recombinant human interferon gamma therapy for osteopetrosis*. J Pediatr, 1992. **121**(1): p. 119-24.
125. Key, L.L., Jr., et al., *Long-term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon gamma*. N Engl J Med, 1995. **332**(24): p. 1594-9.
126. Tamura, K., et al., *Recombinant interferon beta and gamma in the treatment of adult T-cell leukemia*. Cancer, 1987. **59**(6): p. 1059-62.
127. Suarez-Mendez, R., et al., *Adjuvant interferon gamma in patients with drug - resistant pulmonary tuberculosis: a pilot study*. BMC Infect Dis, 2004. **4**: p. 44.
128. Condos, R., et al., *Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 2058-64.
129. Urosevic, M., *Drug evaluation: TG-1042, an adenovirus-mediated IFNgamma gene delivery for the intratumoral therapy of primary cutaneous lymphomas*. Curr Opin Investig Drugs, 2007. **8**(6): p. 493-8.
130. Khorana, A.A., et al., *A phase I trial of immunotherapy with intratumoral adenovirus-interferon-gamma (TG1041) in patients with malignant melanoma*. Cancer Gene Ther, 2003. **10**(4): p. 251-9.
131. Skurkovich, S., et al., *Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis*. Mult Scler, 2001. **7**(5): p. 277-84.
132. Reinisch, W., et al., *Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(2): p. 233-42.
133. Robak, E., et al., *Relationship between peripheral blood dendritic cells and cytokines involved in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Eur Cytokine Netw, 2004. **15**(3): p. 222-30.
134. Alberts, B., et al., *essential cell biology; second edition*. Garland Science. Garland Science, 2004.
135. Couchman, J.R., *Transmembrane signaling proteoglycans*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010. **26**: p. 89-114.
136. Lopes, C.C., C.P. Dietrich, and H.B. Nader, *Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling*. Braz J Med Biol Res, 2006. **39**(2): p. 157-67.
137. Multhaupt, H.A., et al., *Syndecan signaling: when, where and why?* J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 4**: p. 31-8.
138. Choi, Y., et al., *Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity*. Matrix Biol, 2011. **30**(2): p. 93-9.

139. Fitzgerald, M.L., et al., *Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 811-24.
140. Yoneda, A. and J.R. Couchman, *Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans*. Matrix Biol, 2003. **22**(1): p. 25-33.
141. Carey, D.J., *Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors*. Biochem J, 1997. **327** (Pt 1): p. 1-16.
142. Rapraeger, A.C., *Molecular interactions of syndecans during development*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(2): p. 107-16.
143. Xian, X., S. Gopal, and J.R. Couchman, *Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 31-46.
144. Saunders, S., S. Paine-Saunders, and A.D. Lander, *Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain*. Dev Biol, 1997. **190**(1): p. 78-93.
145. Svensson, G., et al., *Crystal structure of N-glycosylated human glypican-1 core protein: structure of two loops evolutionarily conserved in vertebrate glypican-1*. J Biol Chem, 2012. **287**(17): p. 14040-51.
146. Szpirer, C., et al., *Mapping of the rat glypican genes*. Cytogenet Cell Genet, 2001. **93**(1-2): p. 83-6.
147. Filmus, J., M. Capurro, and J. Rast, *Glypicans*. Genome Biol, 2008. **9**(5): p. 224.
148. Song, H.H. and J. Filmus, *The role of glypicans in mammalian development*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1573**(3): p. 241-6.
149. De Cat, B. and G. David, *Developmental roles of the glypicans*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(2): p. 117-25.
150. Wang, A. and B.P. He, *Characteristics and functions of NG2 cells in normal brain and neuropathology*. Neurol Res, 2009. **31**(2): p. 144-50.
151. Wang, X., et al., *CSPG4 in cancer: multiple roles*. Curr Mol Med, 2010. **10**(4): p. 419-29.
152. Myhre, K. and G.C. Blobe, *Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion*. Cell Signal, 2009. **21**(11): p. 1548-58.
153. Bernabeu, C., J.M. Lopez-Novoa, and M. Quintanilla, *The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(10): p. 954-73.
154. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, *CD44: from adhesion molecules to signalling regulators*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 33-45.
155. Iozzo, R.V., *Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(8): p. 646-56.
156. Noonan, D.M., et al., *The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 22939-47.
157. Kirn-Safran, C., M.C. Farach-Carson, and D.D. Carson, *Multifunctionality of extracellular and cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(21): p. 3421-34.
158. Xu, Z., et al., *Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition*. Matrix Biol, 2010. **29**(6): p. 461-70.
159. Burk, K., et al., *Agrin-signaling is necessary for the integration of newly generated neurons in the adult olfactory bulb*. J Neurosci, 2012. **32**(11): p. 3759-64.

160. Burgess, R.W., W.C. Skarnes, and J.R. Sanes, *Agrin isoforms with distinct amino termini: differential expression, localization, and function*. J Cell Biol, 2000. **151**(1): p. 41-52.
161. Ricard-Blum, S., *The collagen family*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(1): p. a004978.
162. Seppinen, L. and T. Pihlajaniemi, *The multiple functions of collagen XVIII in development and disease*. Matrix Biol, 2011. **30**(2): p. 83-92.
163. Iozzo, R.V., J.J. Zoeller, and A. Nystrom, *Basement membrane proteoglycans: modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis*. Mol Cells, 2009. **27**(5): p. 503-13.
164. Marneros, A.G. and B.R. Olsen, *Physiological role of collagen XVIII and endostatin*. FASEB J, 2005. **19**(7): p. 716-28.
165. Ronnberg, E. and G. Pejler, *Serglycin: the master of the mast cell*. Methods Mol Biol, 2012. **836**: p. 201-17.
166. Kolset, S.O. and H. Tveit, *Serglycin--structure and biology*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(7-8): p. 1073-85.
167. Kolset, S.O. and G. Pejler, *Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells*. J Immunol, 2011. **187**(10): p. 4927-33.
168. Pugia, M.J., R. Valdes, Jr., and S.A. Jortani, *Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement*. Adv Clin Chem, 2007. **44**: p. 223-45.
169. Fries, E. and A.M. Blom, *Bikunin--not just a plasma proteinase inhibitor*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(2): p. 125-37.
170. Sarrazin, S., et al., *Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1765**(1): p. 25-37.
171. Rauch, U. and J. Kappler, *Chondroitin/Dermatan sulfates in the central nervous system: their structures and functions in health and disease*. Adv Pharmacol, 2006. **53**: p. 337-56.
172. Sugahara, K. and H. Kitagawa, *Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(5): p. 518-27.
173. Sugahara, K., et al., *Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 612-20.
174. Esko, J.D. and S.B. Selleck, *Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 435-71.
175. Yamada, S., K. Sugahara, and S. Ozbek, *Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study*. Commun Integr Biol, 2011. **4**(2): p. 150-8.
176. Weissmann, B., et al., *Isolation of the aldobionic acid of umbilical cord hyaluronic acid*. J Biol Chem, 1953. **205**(1): p. 205-11.
177. Toole, B.P., *Hyaluronan is not just a goo!* J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 335-6.
178. Davidson, E.A. and K. Meyer, *Chondroitin, a new mucopolysaccharide*. J Biol Chem, 1954. **211**(2): p. 605-11.
179. Taylor, K.R. and R.L. Gallo, *Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation*. FASEB J, 2006. **20**(1): p. 9-22.
180. Trowbridge, J.M. and R.L. Gallo, *Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan*. Glycobiology, 2002. **12**(9): p. 117R-25R.
181. Funderburgh, J.L., *Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function*. Glycobiology, 2000. **10**(10): p. 951-8.

182. Meyer, K., et al., *The mucopolysaccharides of bovine cornea*. J Biol Chem, 1953. **205**(2): p. 611-6.
183. Greiling, H., *Structure and biological functions of keratan sulfate proteoglycans*. EXS, 1994. **70**: p. 101-22.
184. Kjellen, L. and U. Lindahl, *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 443-75.
185. Lindahl, U., M. Kusche-Gullberg, and L. Kjellen, *Regulated diversity of heparan sulfate*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 24979-82.
186. Mulloy, B., *The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides*. An Acad Bras Cienc, 2005. **77**(4): p. 651-64.
187. Gandhi, N.S. and R.L. Mancera, *The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins*. Chem Biol Drug Des, 2008. **72**(6): p. 455-82.
188. Capila, I. and R.J. Linhardt, *Heparin-protein interactions*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(3): p. 391-412.
189. Esko, J.D. and U. Lindahl, *Molecular diversity of heparan sulfate*. J Clin Invest, 2001. **108**(2): p. 169-73.
190. Kearns, A.E., B.M. Vertel, and N.B. Schwartz, *Topography of glycosylation and UDP-xylose production*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11097-104.
191. Vertel, B.M., et al., *Xylosylation is an endoplasmic reticulum to Golgi event*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11105-12.
192. Esko, J.D. and L. Zhang, *Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly*. Curr Opin Struct Biol, 1996. **6**(5): p. 663-70.
193. Kokenyesi, R. and M. Bernfield, *Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 12304-9.
194. Zhang, L. and J.D. Esko, *Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan*. J Biol Chem, 1994. **269**(30): p. 19295-9.
195. Shworak, N.W., et al., *Characterization of ryudocan glycosaminoglycan acceptor sites*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21204-14.
196. Prydz, K. and K.T. Dalen, *Synthesis and sorting of proteoglycans*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 2**: p. 193-205.
197. Bernfield, M., et al., *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 729-77.
198. Victor, X.V., et al., *Investigating the elusive mechanism of glycosaminoglycan biosynthesis*. J Biol Chem, 2009. **284**(38): p. 25842-53.
199. Fransson, L.A., et al., *Biosynthesis of decorin and glypican*. Matrix Biol, 2000. **19**(4): p. 367-76.
200. McCormick, C., et al., *The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 668-73.
201. Lind, T., et al., *The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26265-8.
202. Carlsson, P., et al., *Heparin/heparan sulfate biosynthesis: processive formation of N-sulfated domains*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20008-14.
203. Gallagher, J.T., *Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 357-61.
204. Aikawa, J., et al., *Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5876-82.

205. Wei, Z., et al., *A single protein catalyzes both N-deacetylation and N-sulfation during the biosynthesis of heparan sulfate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 3885-8.
206. Jacobsson, I., et al., *Biosynthesis of heparin. Substrate specificity of heparosan N-sulfate D-glucuronosyl 5-epimerase*. J Biol Chem, 1984. **259**(2): p. 1056-63.
207. Li, J.P., *Glucuronyl C5-epimerase an enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparan sulfate/heparin biosynthesis*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2010. **93**: p. 59-78.
208. Mulloy, B. and M.J. Forster, *Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate*. Glycobiology, 2000. **10**(11): p. 1147-56.
209. Pinhal, M.A., et al., *Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 12984-9.
210. Smeds, E., A. Feta, and M. Kusche-Gullberg, *Target selection of heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase*. Glycobiology, 2010. **20**(10): p. 1274-82.
211. Habuchi, H. and K. Kimata, *Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2010. **93**: p. 79-111.
212. Smeds, E., et al., *Substrate specificities of mouse heparan sulphate glucosaminyl 6-O-sulphotransferases*. Biochem J, 2003. **372**(Pt 2): p. 371-80.
213. Petitou, M., B. Casu, and U. Lindahl, *1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site*. Biochimie, 2003. **85**(1-2): p. 83-9.
214. Kovensky, J., *Sulfated oligosaccharides: new targets for drug development?* Curr Med Chem, 2009. **16**(18): p. 2338-44.
215. Liu, J., et al., *Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 5185-92.
216. Hook, M., et al., *Biosynthesis of heparin. Studies on the microsomal sulfation process*. J Biol Chem, 1975. **250**(15): p. 6065-71.
217. Lindahl, B., L. Eriksson, and U. Lindahl, *Structure of heparan sulphate from human brain, with special regard to Alzheimer's disease*. Biochem J, 1995. **306** (Pt 1): p. 177-84.
218. Maccarana, M., et al., *Domain structure of heparan sulfates from bovine organs*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17804-10.
219. Lindahl, U. and J.P. Li, *Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications*. Int Rev Cell Mol Biol, 2009. **276**: p. 105-59.
220. Gatti, G., B. Casu, and A.S. Perlin, *Conformations of the major residues in heparin. H-NMR spectroscopic studies*. Biochem Biophys Res Commun, 1978. **85**(1): p. 14-20.
221. Atkins, E.D. and I.A. Nieduszynski, *Crystalline structure of heparin*. Adv Exp Med Biol, 1975. **52**: p. 19-37.
222. Mulloy, B., et al., *N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin*. Biochem J, 1993. **293** (Pt 3): p. 849-58.
223. Faham, S., et al., *Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor*. Science, 1996. **271**(5252): p. 1116-20.
224. Mulloy, B., E. Gray, and T.W. Barrowcliffe, *Characterization of unfractionated heparin: comparison of materials from the last 50 years*. Thromb Haemost, 2000. **84**(6): p. 1052-6.
225. Hricovini, M., et al., *Motional properties of E. coli polysaccharide K5 in aqueous solution analyzed by NMR relaxation measurements*. Carbohydr Res, 1997. **300**(1): p. 69-76.

226. Mulloy, B., et al., *The effect of variation of substitution on the solution conformation of heparin: a spectroscopic and molecular modelling study*. Carbohydr Res, 1994. **255**: p. 1-26.
227. Yanagishita, M. and V.C. Hascall, *Cell surface heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9451-4.
228. Tumova, S., et al., *Basic fibroblast growth factor does not prevent heparan sulphate proteoglycan catabolism in intact cells, but it alters the distribution of the glycosaminoglycan degradation products*. Biochem J, 1999. **337** (Pt 3): p. 471-81.
229. Edgren, G., et al., *Glypican (heparan sulfate proteoglycan) is palmitoylated, deglycanated and reglycanated during recycling in skin fibroblasts*. Glycobiology, 1997. **7**(1): p. 103-12.
230. Ashworth, J.L., et al., *Mucopolysaccharidoses and the eye*. Surv Ophthalmol, 2006. **51**(1): p. 1-17.
231. Nam, E.J. and P.W. Park, *Shedding of cell membrane-bound proteoglycans*. Methods Mol Biol, 2012. **836**: p. 291-305.
232. Hayashida, K., W.C. Parks, and P.W. Park, *Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines*. Blood, 2009. **114**(14): p. 3033-43.
233. Lamanna, W.C., et al., *Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27724-35.
234. Rosen, S.D. and H. Lemjabbar-Alaoui, *Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate*. Expert Opin Ther Targets, 2010. **14**(9): p. 935-49.
235. Buono, M. and M.P. Cosma, *Sulfatase activities towards the regulation of cell metabolism and signaling in mammals*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(5): p. 769-80.
236. Fux, L., et al., *Heparanase: busy at the cell surface*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(10): p. 511-9.
237. Sapay, N., et al., *Molecular model of human heparanase with proposed binding mode of a heparan sulfate oligosaccharide and catalytic amino acids*. Biopolymers, 2012. **97**(1): p. 21-34.
238. Linhardt, R.J., et al., *Examination of the substrate specificity of heparin and heparan sulfate lyases*. Biochemistry, 1990. **29**(10): p. 2611-7.
239. Ricard-Blum, S., et al., *Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2927-36.
240. Rabenstein, D.L., *Heparin and heparan sulfate: structure and function*. Nat Prod Rep, 2002. **19**(3): p. 312-31.
241. Hileman, R.E., et al., *Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins*. Bioessays, 1998. **20**(2): p. 156-67.
242. Trevani, A.S., et al., *Extracellular acidification induces human neutrophil activation*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4849-57.
243. Helmlinger, G., et al., *Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 177-82.
244. Bishop, J.R., M. Schuksz, and J.D. Esko, *Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1030-7.
245. Ori, A., M.C. Wilkinson, and D.G. Fernig, *A systems biology approach for the investigation of the heparin/heparan sulfate interactome*. J Biol Chem, 2011. **286**(22): p. 19892-904.

246. Li, W., et al., *Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(9): p. 857-62.
247. Olson, S.T., et al., *Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12528-38.
248. Turnbull, J., A. Powell, and S. Guimond, *Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(2): p. 75-82.
249. Vives, R.R., et al., *A kinetics and modeling study of RANTES(9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization*. Biochemistry, 2002. **41**(50): p. 14779-89.
250. Wang, X., et al., *Oligomeric structure of the chemokine CCL5/RANTES from NMR, MS, and SAXS data*. Structure, 2011. **19**(8): p. 1138-48.
251. Ali, S., et al., *Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11721-7.
252. Proudfoot, A.E., *The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 422-6.
253. Lortat-Jacob, H., A. Grosdidier, and A. Imberty, *Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1229-34.
254. Yayon, A., et al., *Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor*. Cell, 1991. **64**(4): p. 841-8.
255. Rapraeger, A.C., A. Krufka, and B.B. Olwin, *Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation*. Science, 1991. **252**(5013): p. 1705-8.
256. Mohammadi, M., S.K. Olsen, and O.A. Ibrahimi, *Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 107-37.
257. Schlessinger, J., et al., *Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 743-50.
258. Pellegrini, L., et al., *Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin*. Nature, 2000. **407**(6807): p. 1029-34.
259. Kim, S.H., J. Turnbull, and S. Guimond, *Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor*. J Endocrinol, 2011. **209**(2): p. 139-51.
260. Bachy, S., F. Letourneur, and P. Rousselle, *Syndecan-1 interaction with the LG4/5 domain in laminin-332 is essential for keratinocyte migration*. J Cell Physiol, 2008. **214**(1): p. 238-49.
261. Nielsen, P.K., et al., *Identification of a major heparin and cell binding site in the LG4 module of the laminin alpha 5 chain*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14517-23.
262. Sekiguchi, K., et al., *Binding of fibronectin and its proteolytic fragments to glycosaminoglycans. Exposure of cryptic glycosaminoglycan-binding domains upon limited proteolysis*. J Biol Chem, 1983. **258**(23): p. 14359-65.
263. Sadir, R., et al., *Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 43854-60.

264. Vlodavsky, I., et al., *Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(2): p. 121-9.
265. Bank, U. and S. Ansorge, *More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(2): p. 197-206.
266. Buczek-Thomas, J.A., et al., *Elastase mediates the release of growth factors from lung in vivo*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(3): p. 344-50.
267. Vives, R.R., H. Lortat-Jacob, and P. Fender, *Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors : ally or foe?* Curr Gene Ther, 2006. **6**(1): p. 35-44.
268. Chen, Y., et al., *Microbial subversion of heparan sulfate proteoglycans*. Mol Cells, 2008. **26**(5): p. 415-26.
269. Baron, M.J., et al., *Alpha C protein of group B Streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24714-23.
270. Haynes, A., 3rd, et al., *Syndecan 1 shedding contributes to Pseudomonas aeruginosa sepsis*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 7914-21.
271. Hayashida, A., et al., *Staphylococcus aureus beta-toxin induces lung injury through syndecan-1*. Am J Pathol, 2009. **174**(2): p. 509-18.
272. Handel, T.M., et al., *Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 385-410.
273. Kuschert, G.S.V., et al., *Identification of a glycosaminoglycan binding surface on human interleukin-8*. Biochemistry, 1998. **37**(32): p. 11193-11201.
274. Lau, E.K., et al., *Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22294-305.
275. Vassal-Stermann, E., et al., *A New C-Xyloside Induces Modifications of GAG Expression, Structure and Functional Properties*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47933.
276. Proost, P., et al., *Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 2085-97.
277. Lortat-Jacob, H., F. Baltzer, and J.A. Grimaud, *Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence*. J Biol Chem, 1996. **271**(27): p. 16139-43.
278. Proudfoot, A.E., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1885-90.
279. Goger, B., et al., *Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites*. Biochemistry, 2002. **41**(5): p. 1640-6.
280. Kloczek, G. and J. Seelig, *Melittin interaction with sulfated cell surface sugars*. Biochemistry, 2008. **47**(9): p. 2841-9.
281. Goncalves, E., E. Kitas, and J. Seelig, *Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide*. Biochemistry, 2005. **44**(7): p. 2692-702.
282. Fernas, S., et al., *Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis*. Glycobiology, 2008. **18**(12): p. 1054-1064.
283. Fernas, S., et al., *Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(13): p. 4987-4993.

284. Przybylski, C., et al., *HABA-based ionic liquid matrices for UV-MALDI-MS analysis of heparin and heparan sulfate oligosaccharides*. Glycobiology, 2010. **20**(2): p. 224-234.
285. Yang, B., et al., *Hyphenated techniques for the analysis of heparin and heparan sulfate*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **399**(2): p. 541-557.
286. Laurence, J.S., et al., *CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding*. Biochemistry, 2000. **39**(12): p. 3401-9.
287. Dilhas, A., et al., *Mixture synthesis and "charge tagging" based demixing: an efficient strategy for the preparation of heparan sulfate libraries*. J Comb Chem, 2008. **10**(2): p. 166-9.
288. Chen, J., C.L. Jones, and J. Liu, *Using an enzymatic combinatorial approach to identify anticoagulant heparan sulfate structures*. Chem Biol, 2007. **14**(9): p. 986-93.
289. Canales, A., et al., *Conformational flexibility of a synthetic glycosylaminoglycan bound to a fibroblast growth factor. FGF-1 recognizes both the (1)C(4) and (2)S(O) conformations of a bioactive heparin-like hexasaccharide*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(16): p. 5778-9.
290. Blundell, C.D., et al., *The link module from ovulation- and inflammation-associated protein TSG-6 changes conformation on hyaluronan binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 49261-70.
291. Jin, L., et al., *The anticoagulant activation of antithrombin by heparin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14683-8.
292. Sapay, N., et al., *Molecular modeling of the interaction between heparan sulfate and cellular growth factors: bringing pieces together*. Glycobiology, 2011. **21**(9): p. 1181-93.
293. Brinkhous, K.M., et al., *Heparin and Blood Clotting*. Science, 1939. **90**(2345): p. 539.
294. Lam, L.H., J.E. Silbert, and R.D. Rosenberg, *The separation of active and inactive forms of heparin*. Biochem Biophys Res Commun, 1976. **69**(2): p. 570-7.
295. Hook, M., et al., *Anticoagulant activity of heparin: separation of high-activity and low-activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin*. FEBS Lett, 1976. **66**(1): p. 90-3.
296. Choay, J., et al., *Structural studies on a biologically active hexasaccharide obtained from heparin*. Ann N Y Acad Sci, 1981. **370**: p. 644-9.
297. Thunberg, L., G. Backstrom, and U. Lindahl, *Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin*. Carbohydr Res, 1982. **100**: p. 393-410.
298. Petitou, M., et al., *Binding of heparin to antithrombin III: a chemical proof of the critical role played by a 3-sulfated 2-amino-2-deoxy-D-glucose residue*. Carbohydr Res, 1988. **179**: p. 163-72.
299. Shukla, D., et al., *A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry*. Cell, 1999. **99**(1): p. 13-22.
300. Hanouille, X., et al., *Structural and functional characterization of the interaction between cyclophilin B and a heparin-derived oligosaccharide*. J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34148-58.
301. Pye, D.A., et al., *Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2*. Glycobiology, 2000. **10**(11): p. 1183-92.
302. Pye, D.A., et al., *Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 22936-42.

303. Ashikari-Hada, S., et al., *Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12346-54.
304. Lortat-Jacob, H., J.E. Turnbull, and J.A. Grimaud, *Molecular organization of the interferon gamma-binding domain in heparan sulphate*. Biochem J, 1995. **310** (Pt 2): p. 497-505.
305. Robinson, C.J., et al., *VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1731-40.
306. Spillmann, D., D. Witt, and U. Lindahl, *Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15487-93.
307. Stringer, S.E., et al., *Characterization of the binding site on heparan sulfate for macrophage inflammatory protein 1alpha*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1543-50.
308. Kreuger, J., et al., *Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function*. EMBO J, 2002. **21**(23): p. 6303-11.
309. Maccarana, M. and U. Lindahl, *Mode of interaction between platelet factor 4 and heparin*. Glycobiology, 1993. **3**(3): p. 271-7.
310. Kreuger, J., et al., *Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity*. J Cell Biol, 2006. **174**(3): p. 323-7.
311. Catlow, K., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor and its interaction with heparan sulphate and dermatan sulphate*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(2): p. 352-3.
312. Habuchi, H., O. Habuchi, and K. Kimata, *Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code?* Glycoconj J, 2004. **21**(1-2): p. 47-52.
313. Petitou, M. and C.A. van Boeckel, *A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next?* Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(24): p. 3118-33.
314. Lortat-Jacob, H., H. Kleinman, and J.A. Grimaud, *[Connective matrix and localization of a biological signal: demonstration of a matrix receptor for interferon-gamma in basement membranes]*. C R Acad Sci III, 1990. **311**(4): p. 143-7.
315. Camejo, E.H., et al., *Interferon gamma binds to extracellular matrix chondroitin-sulfate proteoglycans, thus enhancing its cellular response*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(9): p. 1456-65.
316. Lortat-Jacob, H. and J.A. Grimaud, *Binding of interferon-gamma to heparan sulfate is restricted to the heparin-like domains and involves carboxylic--but not N-sulfated--groups*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1117**(2): p. 126-30.
317. Douglas, M.S., et al., *Examination of the mechanism by which heparin antagonizes activation of a model endothelium by interferon-gamma (IFN-gamma)*. Clin Exp Immunol, 1997. **107**(3): p. 578-84.
318. Lortat-Jacob, H., H.K. Kleinman, and J.A. Grimaud, *High-affinity binding of interferon-gamma to a basement membrane complex (matrigel)*. J Clin Invest, 1991. **87**(3): p. 878-83.
319. Vanhaverbeke, C., et al., *NMR characterization of the interaction between the C-terminal domain of interferon-gamma and heparin-derived oligosaccharides*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 1): p. 93-9.
320. Sarrazin, S., et al., *Heparan sulfate mimicry: a synthetic glycoconjugate that recognizes the heparin binding domain of interferon-gamma inhibits the cytokine activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37558-64.
321. Lubineau, A., et al., *Synthesis of tailor-made glycoconjugate mimetics of heparan sulfate that bind IFN-gamma in the nanomolar range*. Chemistry, 2004. **10**(17): p. 4265-82.

322. Fernandez-Botran, R., J. Yan, and D.E. Justus, *Binding of interferon gamma by glycosaminoglycans: a strategy for localization and/or inhibition of its activity*. Cytokine, 1999. **11**(5): p. 313-25.
323. Lortat-Jacob, H., et al., *Lobular--but not periovular--inhibition of collagen deposition in the liver of S. mansoni infected mice using interferon-gamma*. J Hepatol, 1997. **26**(4): p. 894-903.
324. Lortat-Jacob, H., et al., *Non-receptor-mediated tissue localization of human interferon-gamma: role of heparan sulfate/heparin-like molecules*. Cytokine, 1996. **8**(7): p. 557-66.
325. Fluhr, H., et al., *Heparin inhibits interferon-gamma signaling in human endometrial stromal cells by interference with the cellular binding of interferon-gamma*. Fertil Steril, 2011. **95**(4): p. 1272-7.
326. Lortat-Jacob, H., P. Esterre, and J.A. Grimaud, *Interferon-gamma, an anti-fibrogenic cytokine which binds to heparan sulfate*. Pathol Res Pract, 1994. **190**(9-10): p. 920-2.
327. Sarrazin, S., *Caractérisation des interactions glycosaminoglycannes/protéines dans le but de développer des molécules d'intérêt thérapeutique: exemples de l'endocan et de l'interferon gamma*. Manuscrit de thèse, 2007.
328. Arora, D. and N. Khanna, *Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies*. J Biotechnol, 1996. **52**(2): p. 127-33.
329. Freyer, M.W. and E.A. Lewis, *Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions*. Methods Cell Biol, 2008. **84**: p. 79-113.
330. Tholey, A. and E. Heinzle, *Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives*. Anal Bioanal Chem, 2006. **386**(1): p. 24-37.
331. Przybylski, C., et al., *HABA-based ionic liquid matrices for UV-MALDI-MS analysis of heparin and heparan sulfate oligosaccharides*. Glycobiology, 2010. **20**(2): p. 224-34.
332. Armstrong, D.W., et al., *Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal Chem, 2001. **73**(15): p. 3679-86.
333. Zabet-Moghaddam, M., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the characterization of ionic liquids and the analysis of amino acids, peptides and proteins in ionic liquids*. J Mass Spectrom, 2004. **39**(12): p. 1494-505.
334. Laremore, T.N., F. Zhang, and R.J. Linhardt, *Ionic liquid matrix for direct UV-MALDI-TOF-MS analysis of dermatan sulfate and chondroitin sulfate oligosaccharides*. Anal Chem, 2007. **79**(4): p. 1604-10.
335. Fukuyama, Y., et al., *Ionic liquid matrixes optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides*. Anal Chem, 2008. **80**(6): p. 2171-9.
336. Tissot, B., et al., *Towards GAG glycomics: analysis of highly sulfated heparins by MALDI-TOF mass spectrometry*. Glycobiology, 2007. **17**(9): p. 972-82.
337. Stringer, S.E. and J.T. Gallagher, *Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20508-14.
338. Kett, W.C., et al., *Avidin is a heparin-binding protein. Affinity, specificity and structural analysis*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1620**(1-3): p. 225-34.
339. Vives, R.R., et al., *Sequence analysis of heparan sulphate and heparin oligosaccharides*. Biochem J, 1999. **339** (Pt 3): p. 767-73.

340. Sun, J., et al., *Interaction of synthetic HPV-16 capsid peptides with heparin: thermodynamic parameters and binding mechanism*. J Phys Chem B, 2010. **114**(30): p. 9854-61.
341. Record, M.T., Jr., M.L. Lohman, and P. De Haseth, *Ion effects on ligand-nucleic acid interactions*. J Mol Biol, 1976. **107**(2): p. 145-58.
342. Manning, G.S., *The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides*. Q Rev Biophys, 1978. **11**(2): p. 179-246.
343. Saucedo, J.C., R.M. Duke, and M. Nitz, *Designing fluorescent sensors of heparin*. Chembiochem, 2007. **8**(4): p. 391-4.
344. Rullo, A. and M. Nitz, *Importance of the spatial display of charged residues in heparin-peptide interactions*. Biopolymers, 2010. **93**(3): p. 290-8.
345. Turnbull, J.E., et al., *Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10337-41.
346. Loo, B.M., et al., *Binding of heparin/heparan sulfate to fibroblast growth factor receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16868-76.
347. Heegaard, N.H., S. Nilsson, and N.A. Guzman, *Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998. **715**(1): p. 29-54.
348. Busch, M.H., et al., *Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis*. J Chromatogr A, 1997. **777**(2): p. 311-28.
349. Gao, J.Y., P.L. Dubin, and B.B. Muhoberac, *Measurement of the binding of proteins to polyelectrolytes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis*. Anal Chem, 1997. **69**(15): p. 2945-51.
350. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Capillary zone electrophoresis*. Science, 1983. **222**(4621): p. 266-72.
351. Prull-Janssen, M., *Interaction cytokines/glycosaminoglycans comme cible d'une nouvelle approche thérapeutique*. Manuscrit de thèse, 2011.
352. Manisali, I., D.D.Y. Chen, and B.B. Schneider, *Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2006. **25**(3): p. 243-256.
353. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(7): p. 804-817.
354. Poitevin, M., et al., *Use of quasi-isoelectric buffers to limit protein adsorption in capillary zone electrophoresis*. Electrophoresis, 2008. **29**(15): p. 3164-7.
355. Yang, C. and Z. El Rassi, *Capillary zone electrophoresis of proteins with fused-silica capillaries having polymers and surfactants adsorbed onto surfactant moieties previously covalently bound to the capillary column surface*. Electrophoresis, 1998. **19**(13): p. 2278-84.
356. Chayen, N.E. and E. Saridakis, *Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal*. Nat Methods, 2008. **5**(2): p. 147-53.
357. Geerlof, A., et al., *The impact of protein characterization in structural proteomics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2006. **62**(Pt 10): p. 1125-36.
358. *17 Protein disorder prediction servers*. <http://rosettadesigngroup.com/blog/521/17-protein-disorder-prediction-servers/>.
359. Dosztanyi, Z., et al., *IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content*. Bioinformatics, 2005. **21**(16): p. 3433-4.

360. Dosztanyi, Z., et al., *The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins*. J Mol Biol, 2005. **347**(4): p. 827-39.
361. iupred, <http://iupred.enzim.hu/>.
362. Hassell, A.M., et al., *Crystallization of protein-ligand complexes*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007. **63**(Pt 1): p. 72-9.
363. Samudzi, C.T., L.E. Burton, and J.R. Rubin, *Crystal structure of recombinant rabbit interferon-gamma at 2.7-A resolution*. J Biol Chem, 1991. **266**(32): p. 21791-7.
364. Randal, M. and A.A. Kossiakoff, *The 2.0 A structure of bovine interferon-gamma; assessment of the structural differences between species*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000. **56**(Pt 1): p. 14-24.
365. Budayova-Spano, M., et al., *Crystallization of a recombinant form of the complete sequence of human gamma-interferon: characterization by small-angle X-ray scattering, mass spectrometry and preliminary X-ray diffraction studies*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 6): p. 900-5.
366. Macchi, P., *Cryo-crystallography: diffraction at low temperature and more*. Top Curr Chem, 2012. **315**: p. 33-67.
367. Morris, A.L., et al., *Stereochemical quality of protein structure coordinates*. Proteins, 1992. **12**(4): p. 345-64.
368. Brunger, A.T., *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. Nature, 1992. **355**(6359): p. 472-5.
369. labs, H., <https://embl.fr/htxlab/>.
370. Matthews, B.W., *Solvent content of protein crystals*. J Mol Biol, 1968. **33**(2): p. 491-7.
371. Kantardjieff, K.A. and B. Rupp, *Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals*. Protein Sci, 2003. **12**(9): p. 1865-71.
372. Lortat-Jacob, H. and J.A. Grimaud, *Interferon-gamma C-terminal function: new working hypothesis. Heparan sulfate and heparin, new targets for IFN-gamma, protect, relax the cytokine and regulate its activity*. Cell Mol Biol, 1991. **37**(3): p. 253-60.
373. Ho, Y., et al., *The oligomeric structure of vaccinia viral envelope protein A27L is essential for binding to heparin and heparan sulfates on cell surfaces: a structural and functional approach using site-specific mutagenesis*. J Mol Biol, 2005. **349**(5): p. 1060-71.
374. Sadir, R., et al., *Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8288-96.
375. Lerch, T.F. and M.S. Chapman, *Identification of the heparin binding site on adeno-associated virus serotype 3B (AAV-3B)*. Virology, 2012. **423**(1): p. 6-13.
376. Li, S., et al., *Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparan sulfate binding activity*. J Biol Chem, 2010. **285**(47): p. 36645-55.
377. Lira, C.B., et al., *DNA and heparin chaperone the refolding of purified recombinant replication protein A subunit 1 from Leishmania amazonensis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(2): p. 119-25.
378. Nallamsetty, S., et al., *Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of Escherichia coli*. Protein Sci, 2005. **14**(12): p. 2964-71.
379. Cho, H.J., et al., *Maltose binding protein facilitates high-level expression and functional purification of the chemokines RANTES and SDF-1alpha from Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2008. **60**(1): p. 37-45.

380. Das, U., et al., *Inhibition of protein aggregation: supramolecular assemblies of arginine hold the key*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1176.
381. Meng, F., Y. Park, and H. Zhou, *Role of proline, glycerol, and heparin as protein folding aids during refolding of rabbit muscle creatine kinase*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(7): p. 701-9.
382. Greenlund, A.C., et al., *Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 18103-10.
383. Liang, Y., *Applications of isothermal titration calorimetry in protein science*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(7): p. 565-76.
384. Velazquez Campoy, A. and E. Freire, *ITC in the post-genomic era...? Priceless*. Biophys Chem, 2005. **115**(2-3): p. 115-24.
385. Pierce, M.M., C.S. Raman, and B.T. Nall, *Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions*. Methods, 1999. **19**(2): p. 213-21.
386. Ahl, I.M., B.H. Jonsson, and L.A. Tibell, *Thermodynamic characterization of the interaction between the C-terminal domain of extracellular superoxide dismutase and heparin by isothermal titration calorimetry*. Biochemistry, 2009. **48**(41): p. 9932-40.
387. Guzman-Casado, M., et al., *Energetics of heparin binding to human acidic fibroblast growth factor*. Int J Biol Macromol, 2002. **31**(1-3): p. 45-54.
388. Ziegler, A. and J. Seelig, *Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters*. Biophys J, 2004. **86**(1 Pt 1): p. 254-63.
389. Wiseman, T., et al., *Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter*. Anal Biochem, 1989. **179**(1): p. 131-7.
390. Turnbull, W.B. and A.H. Daranas, *On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?* J Am Chem Soc, 2003. **125**(48): p. 14859-66.
391. Velazquez-Campoy, A. and E. Freire, *Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 186-91.
392. Record, M.T., Jr., C.F. Anderson, and T.M. Lohman, *Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity*. Q Rev Biophys, 1978. **11**(2): p. 103-78.
393. Meager, A., *Biological assays for interferons*. J Immunol Methods, 2002. **261**(1-2): p. 21-36.
394. Lortat-Jacob, H. and J.A. Grimaud, *[The extracellular matrix: from supporting tissue to regulation of cytokines]*. Pathol Biol (Paris), 1994. **42**(6): p. 612-20.
395. Olson, S.T., H.R. Halvorson, and I. Bjork, *Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models*. J Biol Chem, 1991. **266**(10): p. 6342-52.
396. Powell, A.K., et al., *Generating heparan sulfate saccharide libraries for glycomics applications*. Nat Protoc, 2010. **5**(5): p. 821-33.
397. Liu, R., et al., *Chemoenzymatic design of heparan sulfate oligosaccharides*. J Biol Chem, 2010. **285**(44): p. 34240-9.
398. Xu, Y., et al., *Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins*. Science, 2011. **334**(6055): p. 498-501.
399. Hamza, D., et al., *First synthesis of heparan sulfate tetrasaccharides containing both N-acetylated and N-unsubstituted glucosamine-search for putative 10E4 epitopes*. Chembiochem, 2006. **7**(12): p. 1856-8.
400. Zaia, J., *Mass spectrometry of oligosaccharides*. Mass Spectrom Rev, 2004. **23**(3): p. 161-227.

401. Laremore, T.N. and R.J. Linhardt, *Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric detection of glycosaminoglycan disaccharides as cesium salts*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. **21**(7): p. 1315-20.
402. Bultel, L., et al., *UV-MALDI-TOF mass spectrometry analysis of heparin oligosaccharides obtained by nitrous acid controlled degradation and high performance anion exchange chromatography*. J Am Soc Mass Spectrom, 2010. **21**(1): p. 178-90.
403. Linhardt, R.J., P.M. Galliher, and C.L. Cooney, *Polysaccharide lyases*. Appl Biochem Biotechnol, 1986. **12**(2): p. 135-76.
404. Pejler, G., et al., *Structure and antithrombin-binding properties of heparin isolated from the clams Anomalocardia brasiliiana and Tivela mactroides*. J Biol Chem, 1987. **262**(24): p. 11413-21.
405. Powell, A.K., et al., *Interactions of heparin/heparan sulfate with proteins: appraisal of structural factors and experimental approaches*. Glycobiology, 2004. **14**(4): p. 17R-30R.
406. Fermas, S., et al., *Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex*. Anal Chem, 2007. **79**(13): p. 4987-93.
407. Naimy, H., N. Leymarie, and J. Zaia, *Screening for anticoagulant heparan sulfate octasaccharides and fine structure characterization using tandem mass spectrometry*. Biochemistry, 2010. **49**(17): p. 3743-52.
408. Lyon, M., J.A. Deakin, and J.T. Gallagher, *Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design*. J Biol Chem, 1994. **269**(15): p. 11208-15.
409. Skidmore, M.A., et al., *Disaccharide compositional analysis of heparan sulfate and heparin polysaccharides using UV or high-sensitivity fluorescence (BODIPY) detection*. Nat Protoc, 2010. **5**(12): p. 1983-92.
410. Skidmore, M., et al., *Labelling heparan sulphate saccharides with chromophore, fluorescence and mass tags for HPLC and MS separations*. Methods Mol Biol, 2009. **534**: p. 157-69.
411. Gandhi, N.S., et al., *Characterization of sequence and structural features of the Candida krusei enolase*. In Silico Biol, 2008. **8**(5-6): p. 449-60.
412. PDB, R., <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
413. Imberty, A., H. Lortat-Jacob, and S. Perez, *Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions*. Carbohydr Res, 2007. **342**(3-4): p. 430-9.
414. Vedadi, M., et al., *Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 15835-40.
415. Capila, I., et al., *Annexin V--heparin oligosaccharide complex suggests heparan sulfate--mediated assembly on cell surfaces*. Structure, 2001. **9**(1): p. 57-64.
416. Fry, E.E., et al., *The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex*. EMBO J, 1999. **18**(3): p. 543-54.
417. Shaya, D., et al., *Crystal structure of heparinase II from Pedobacter heparinus and its complex with a disaccharide product*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15525-35.
418. Moon, A.F., et al., *Structural analysis of the sulfotransferase (3-o-sulfotransferase isoform 3) involved in the biosynthesis of an entry receptor for herpes simplex virus 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 45185-93.
419. Garman, E.F. and R.L. Owen, *Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2006. **62**(Pt 1): p. 32-47.

420. Sousa, R., *Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1995. **51**(Pt 3): p. 271-7.
421. Cudney, R., et al., *Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994. **50**(Pt 4): p. 414-23.
422. Laguri, C., et al., *¹³C-labeled heparan sulfate analogue as a tool to study protein/heparan sulfate interactions by NMR spectroscopy: application to the CXCL12alpha chemokine*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(25): p. 9642-5.
423. Koshland, D.E., Jr., W.J. Ray, Jr., and M.J. Erwin, *Protein structure and enzyme action*. Fed Proc, 1958. **17**(4): p. 1145-50.
424. Horvath, C.M., *The Jak-STAT pathway stimulated by interferon gamma*. Sci STKE, 2004. **2004**(260): p. tr8.
425. Sarrazin, S., W.C. Lamanna, and J.D. Esko, *Heparan sulfate proteoglycans*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
426. Raman, R., V. Sasisekharan, and R. Sasisekharan, *Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions*. Chem Biol, 2005. **12**(3): p. 267-77.
427. Fromm, J.R., et al., *Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor*. Arch Biochem Biophys, 1995. **323**(2): p. 279-87.
428. Dunker, A.K., et al., *Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks*. FEBS J, 2005. **272**(20): p. 5129-48.
429. Dunker, A.K., et al., *Function and structure of inherently disordered proteins*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(6): p. 756-64.
430. Uversky, V.N., et al., *Prediction of intrinsic disorder and its use in functional proteomics*. Methods Mol Biol, 2007. **408**: p. 69-92.
431. Laguri, C., F. Arenzana-Seisdedos, and H. Lortat-Jacob, *Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example*. Carbohydr Res, 2008. **343**(12): p. 2018-23.
432. Laguri, C., et al., *The novel CXCL12gamma isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e1110.
433. Lortat-Jacob, H., *The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(5): p. 543-8.
434. Kamerzell, T.J., et al., *Parathyroid hormone is a heparin/polyanion binding protein: binding energetics and structure modification*. Protein Sci, 2007. **16**(6): p. 1193-203.
435. Lortat-Jacob, H., *Interferon and heparan sulphate*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 461-4.
436. Nagamine, S., et al., *Organ-specific sulfation patterns of heparan sulfate generated by extracellular sulfatases Sulf1 and Sulf2 in mice*. J Biol Chem, 2012. **287**(12): p. 9579-90.
437. Shi, X. and J. Zaia, *Organ-specific heparan sulfate structural phenotypes*. J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 11806-14.
438. Gomes, R.R., Jr., et al., *Spatiotemporal distribution of heparan sulfate epitopes during murine cartilage growth plate development*. Histochem Cell Biol, 2006. **126**(6): p. 713-22.
439. Bulow, H.E. and O. Hobert, *Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development*. Neuron, 2004. **41**(5): p. 723-36.
440. Coombe, D.R. and W.C. Kett, *Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(4): p. 410-24.

441. Lindahl, U., *Heparan sulfate-protein interactions--a concept for drug design?* Thromb Haemost, 2007. **98**(1): p. 109-15.
442. Casu, B., A. Naggi, and G. Torri, *Heparin-derived heparan sulfate mimics to modulate heparan sulfate-protein interaction in inflammation and cancer.* Matrix Biol, 2010. **29**(6): p. 442-52.
443. Lever, R. and C. Page, *Glycosaminoglycans, airways inflammation and bronchial hyperresponsiveness.* Pulm Pharmacol Ther, 2001. **14**(3): p. 249-54.
444. Coombe, D.R. and W.C. Kett, *Heparin mimetics.* Handb Exp Pharmacol, 2012(207): p. 361-83.
445. Walenga, J.M., et al., *Fondaparinux: a synthetic heparin pentasaccharide as a new antithrombotic agent.* Expert Opin Investig Drugs, 2002. **11**(3): p. 397-407.
446. Guimond, S., et al., *Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4.* J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 23906-14.
447. van Amsterdam, R.G., et al., *Synthetic analogues of the antithrombin III-binding pentasaccharide sequence of heparin. Prediction of in vivo residence times.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(4): p. 495-503.
448. Aviezer, D., et al., *Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to its receptor.* J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 114-21.
449. Liu, L., et al., *Synthesis of a heparan sulfate mimetic library targeting FGF and VEGF via click chemistry on a monosaccharide template.* ChemMedChem, 2012. **7**(7): p. 1267-75.
450. Chaires, J.B., *Calorimetry and thermodynamics in drug design.* Annu Rev Biophys, 2008. **37**: p. 135-51.
451. Grey, J.L. and D.H. Thompson, *Challenges and opportunities for new protein crystallization strategies in structure-based drug design.* Expert Opin Drug Discov, 2010. **5**(11): p. 1039-45.
452. Ferenczy, G., *[Structure-based drug design].* Acta Pharm Hung, 1998. **68**(1): p. 21-31.

ANNEXE

Continuous Evolution Profiles for Electronic Tongue Based Analysis **

Yanxia Hou,* Maria Genua, Dayane Tada Batista, Roberto Calemczuk, Arnaud Buhot, Pauline Fornarelli, Jamal Koubachi, David Bonnaffé,* Els Saesen, Cédric Laguri, Hugues Lortat-Jacob and Thierry Livache*

The last decade witnessed a rapidly growing interest in electronic noses/tongues (eN/eT) due to their potential in a wide range of domains such as: controlling the quality of foods and beverages,^[1-3] monitoring pollutants and explosives in the environment^[4-6] and diagnosing diseases such as cancer.^[7,8] In contrast to conventional biosensors and biochips, which are based on “lock-to-key” recognition principle, eN/eT are based on differential binding of analytes to an array of cross-reactive receptors (CRRs), that do not need to be highly specific or selective for the target molecules. Indeed, it is the combined response of all the receptors that creates a distinct pattern for each compound, like a fingerprint, allowing its identification in pure or mixed samples.^[9] Such an approach allows bypassing the complex and time-consuming process of designing and synthesizing the set of specific receptors needed to recognize each analyte. In this regard, eN/eT represent a definitive advantage for the analysis of a complex milieu containing a vast number of structurally diverse molecules.

In examining antibody-protein or protein-protein interactions as model, some rational eT methodologies have been developed for detecting and identifying proteins.^[10-12] Synthetic tetraphenylporphyrin derivatives have thus been used as CRRs to identify proteins and protein mixtures by measuring fluorescence quenching of the receptors upon interaction with the analytes.^[13,14] Alternatively, a library of tripeptide and boronic acid moieties, synthesized in a combinatorial way on a hexasubstituted benzene scaffold, has been developed for sensing proteins with an indicator-uptake colorimetric detection.^[15] Such approaches are very promising, although limited by the relatively high analyte

concentrations needed for efficient sensing (above ten μM). A major improvement was achieved with a sensor array composed of different cationic functionalized gold nanoparticles and an anionic fluorescent polymer poly(p-phenyleneethynylene) (PPE). This system was able to detect and identify proteins in the low nanomolar range^[16] as well as bacteria^[17] and to differentiate normal cells from their cancerous and metastatic counterparts.^[18] Furthermore, by replacing PPE with green fluorescent protein, the sensor array was able to discriminate different concentrations of the same protein, as well as a mixture of proteins in human serum at physiologically relevant concentrations.^[19] This last result illustrates the potential of eT in profiling real samples for diagnosing disease states. However, the preparation of eN/eT sensing arrays still requires designing and synthesizing from 5 to 29 CRRs and conjugating them to a simple and ligand independent detection system. The development and spreading of new eN/eT applications should be greatly facilitated if the production of sensing elements, able to distinguish among structurally similar analytes in simple and even complex solutions, was simplified.

In this regard, we reasoned that the design and synthetic efforts needed to prepare an eN/eT could be drastically reduced if the CRRs were prepared by self-assembly of a restricted set of building blocks (BBs), ideally small and easily accessible molecules displaying different physicochemical properties. Upon combining such BBs in varying and controlled proportions, a collection of combinatorial cross-reactive receptors (CoCRRs) with evolutive properties could be obtained. A major advantage of this approach is to allow a very quick growth of the diversity: eleven CoCRRs can be prepared by mixing only two BBs with concentration varying from 0 to 100% in 10 % increment, while 66 can theoretically be accessed by adding a third BB. Such growth can be generalized to n BBs and i % concentration increment, leading to an impressive number of $\frac{[(100/i)+n-1]}{(n-1)!} \cdot (100/i)!$ potential different CoCRRs. In order to assure both a good match between the CoCRRs precursor mix and their reproducible assembly, we further reasoned that the BBs should be designed to allow formation of self-assembled monolayers (SAMs) on a surface. In addition, such chemistry should allow arraying the BB mixtures on a surface with spatial encoding of their composition, thus facilitating the screening procedure. In this new eT approach, surface plasmon resonance imaging (SPRi)^[20] seems to be the ideal tool for protein sensing on the CoCRRs array. Indeed the gold surface of the SPRi prism should allow easy formation of SAMs through thiol or disulfide chemistry,^[21] while recording the changes in reflectivity of all the spots upon infusion of protein solutions, should provide label free, synchronous, parallel and real-time observation of binding events on the CoCRRs array (Fig. 1).

In order to challenge this new paradigm, we designed a model array inspired by the way cell surface heparan sulfates (HS) recognize HS binding proteins (HSbps). HS are linear and highly sulfated polysaccharides displaying a high degree of molecular diversity that arises from the regulated assembly, during their

[*] Dr. Y. Hou, M. Genua, Dr. D. Tada. Batista, Dr. A. Buhot, Dr. R. Calemczuk, Dr. T. Livache
SPRAM, UMR 5819 (CEA-CNRS-UJF-Grenoble 1)
INAC/CEA-Grenoble
38054 Grenoble cedex 9 (France)
Fax: (+33) 4 38 78 51 45
E-mail: yanxia.hou-broutin@cea.fr; thierry.livache@cea.fr

Prof. D. Bonnaffé, P. Fornarelli, Dr. J. Koubachi
ICMMO/G2M/LCOM, UMR 8182 (CNRS-UPS)
LabEx LERMIT
Université Paris-Sud 11
91405 Orsay cedex (France)
E-mail: david.bonnaffe@u-psud.fr

E. Saesen, C. Laguri, Dr. H. Lortat-Jacob
Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 (CEA-CNRS-
UJF-Grenoble 1)
38027 Grenoble cedex 01 (France)

[**] This work has been financially supported by the French National Research Agency (ANR-grant 06-NANO-045).



Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

biosynthesis, of variously epimerized and sulfated disaccharides. According to cell type and activation state, HS chains with different charge topologies are expressed, with the presumed aim of promoting tight and selective interactions with HSbps.^[22-25] We hypothesize that a first "proof of principle" array of CoCRRs, with differential binding affinity towards HSbps, could be prepared from defined mixtures of modified lactose **BB1** and modified sulfated lactose **BB2** (Fig. 1 and 2). The two BBs may easily be derived from β -allyl lactoside^[26] and are hydrophilic, but **BB1** is uncharged, while **BB2** is fully sulfated and thus highly negatively charged. The variation of the sulfated lactose **BB2** concentration in the CoCRRs may provide different charge densities susceptible to promote the binding of HSbps by electrostatic interaction and to allow differentiating three HSbps: the α and γ isoforms of the chemokine CXCL12^[27] along with the pro-inflammatory cytokine interferon- γ (IFN γ).^[28] The galactose binding lectin from *Erythrina cristagalli* (ECL)^[29] was added to this set as non HSbps reference. It is noteworthy that the CoCRR composed of pure **BB1** should play the role of a positive reference for ECL and, simultaneously, of a negative control for the three HSbps whose binding rely strictly on the sulfate density of the HS glycan chain.

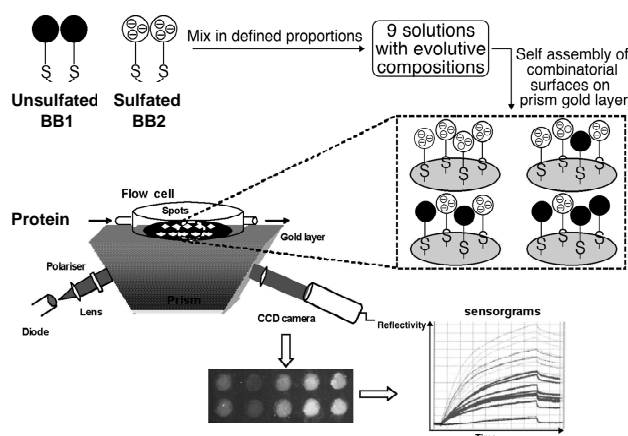


Figure 1. Schematic illustration of a novel electronic tongue composed of a combinatorial cross-reactive receptors array, obtained by self assembly of mixtures of building blocks **BB1** and **BB2** spotted on the gold surface of a SPRi prism, allowing protein sensing by SPR imaging.

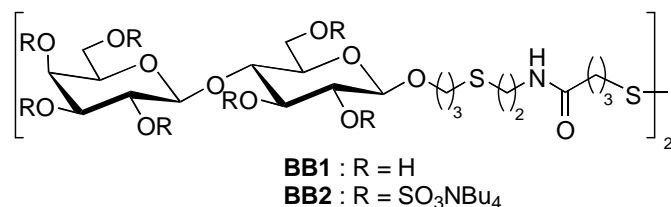


Figure 2. Structures of the two disulfide building blocks **BB1** and **BB2** used for constructing combinatorial cross-reactive receptors array.

Using **BB1** and **BB2**, at a constant total concentration of 20 μ M, we prepared nine mixtures with $[\text{BB1}]/([\text{BB1}]+[\text{BB2}])$ ratios of 0, 10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 and 100%. These mixtures were then spotted on the gold surface of a SPRi prism to generate, by self-assembly, an array composed of nine CoCRRs. For each spot, the ratio of the two building blocks anchored on the gold surface was assumed to be equal to the molar ratio in the mixture solution.

Initially, solutions of ECL at different concentrations (200, 400, 800 nM and 1.6 μ M) were used to probe the system. Gratifyingly, the spots lighted up at different grey-level upon infusion of the lectin solutions. The images were recorded and subsequently converted to a series of sensorgrams. The data recorded at the end of complete protein injection was used to establish a calibration curve. The average reflectivity signals on CoCRRs for various ECL injection concentrations represent a calibration curve that fits a Langmuir adsorption profile (Fig. S4 in supporting information), confirming the capacity of our system to function as a detection array.

At first, in order to probe the ability of the CoCRRs array to differentiate HSbps from non HSbps analytes, we sequentially injected solutions of ECL (200 nM), CXCL12 α and γ (both 100 nM) and IFN γ (25 nM). Analysis of the sensorgrams (not shown) revealed that, for a given protein, the different CoCRRs displayed different reflectivities. More importantly, the individual response of each protein on a given CoCRR is dependant on the composition of the parent BB mixture. In other words, for a given CoCRR composition, the intensity of the response is dependent on the protein injected, indicating that the CoCRRs array responds differently toward each protein, as illustrated in Fig. 3.

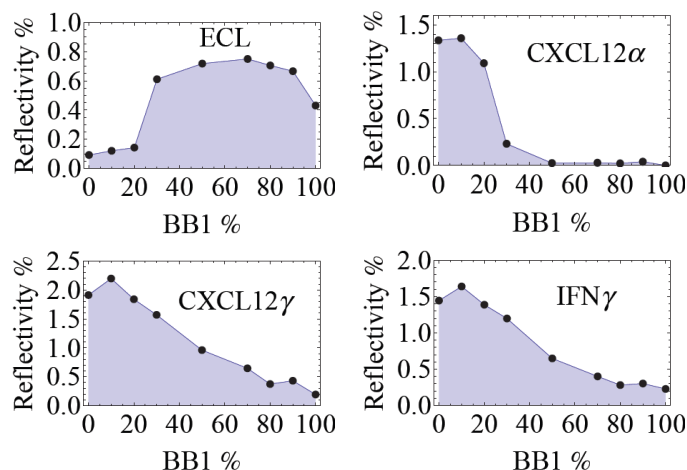


Figure 3. Continuous Evolution Profiles (CEP) obtained with the CoCRRs array for proteins ECL (200 nM), CXCL12 α (100 nM), CXCL12 γ (100 nM) and IFN γ (25 nM). The recognition patterns were generated by plotting the reflectivity at the end of injection versus the **BB1**/(**BB1**+**BB2**) ratio.

The results detailed above could be considered as sufficient to establish the **BB1**-**BB2** CoCRRs arrays coupled to SPRi detection as efficient eT. But, most interestingly, an original and advantageous behavior of the combinatorial receptor array approach emerge from the data presented in Fig. 3a: the response obtained on a given CoCRR for a given protein is not the simple linear addition of the responses obtained on the pure **BB1** and **BB2** spots. This non-linear behavior justifies a posteriori the use of such a set of CoCRRs since the response obtained with each combinatorial receptor introduces supplementary information. It is noteworthy that another key characteristic of this system is that the composition of each CoCRR is linked and close to that of its neighbors by construction. As a result it can provide a signal that is coherent to that of its neighbor. Therefore, the series of data generated by the CoCRRs array can be considered as continuous. Herein, for each protein, a recognition pattern with a Continuous Evolution Profile (CEP) can be interpolated. This behavior is in striking contrast with the sets of

uncorrelated discrete data obtained with traditional eN/eT approaches. This unique advantage is deeply rooted in the receptor array design. The signal of one receptor correlates with the others and consequently abnormal signals can be excluded, just like our brain is still able to reconstruct an image from a screen with defective pixels. Furthermore, infusion of each protein at different concentrations demonstrated that, although the intensity of the signals varied according to the concentration, the shape of the CEP remained unchanged. Therefore, in principle, the CEP shape can be used for identification and its intensity for quantification purposes.

We thus further explored whether the CEP obtained for each protein could be used for reliable identification. As shown in Fig. 3, the ECL's CEP, reaching a maximum for the CoCRR containing 70% of **BB1**, is completely different from the ones obtained for the three HSbps displaying maximal signals at 10%. This indicates, as expected, that ECL has a higher affinity for CoCRRs rich in **BB1**. In contrast, the HSbps have higher affinity for CoCRRs with higher content in **BB2**. Therefore, the CEP analysis allows easy differentiation of ECL from the other proteins. Regarding HSbps, the situation could have been more intractable; however, as shown in Fig. 3, the CEP of CXCL12 α is easily differentiated from CXCL12 γ 's one. Indeed, for CXCL12 α the reflectivity is almost zero when **BB1** content in the CoCRRs is 50% or higher, whereas CXCL12 γ still binds significantly on such a CoCRR. Regarding the third HSbps, IFN γ , its CEP is proved to be easily differentiated from the one of CXCL12 α , although barely from CXCL12 γ 's one. It may seem paradoxical that the two CXCL12 isoforms were better discriminated than CXCL12 γ from IFN γ . However, we believe that, on the contrary, it reveals a unique and advantageous behavior of the **BB1-BB2** CoCRRs array for the analysis of HSbps. From a structural point of view, both CXCL12 isoforms share the same first 68 amino acids, which are similarly folded and display a typical HS binding site (K24-K27-R41) located in a highly structured domain. But, CXCL12 γ possesses an additional HS binding site composed of 30 amino acids in unfolded C-terminal extension.^[27] IFN γ , which is a C₂ symmetric homodimer in solution, folds into a rigid core, flanked by the C-terminal regions of each subunit that contain two clusters of basic residues and display a high conformational flexibility.^[28] Thus, in contrast to CXCL12 α , both CXCL12 γ and IFN γ possess distant HS binding domains, at least one of them being located in an unfolded part of the protein. In addition, the high flexibility of the C-termini of both CXCL12 γ and IFN γ , should maximise contact points with their ligands at low energetic cost through conformational fluctuations of their glycosaminoglycan (GAG) binding sites.^[30] On the other hand, the single CXCL12 α HS binding domain is located in a domain probably too rigid to allow adapting the basic residues conformations to low charge density CoCRRs. Taken together; these results point out that the **BB1-BB2** CoCRRs array is very sensitive to the protein charge topologies and it could provide reliable protein identification. Moreover, regarding HS-protein interactions, the approach we describe here offers an unprecedented and simple tool to investigate when the overall organization of the HS domains (charge density and distribution along the chain) prime over the fine structure found in the polymer (specific sulfation and epimerization sequences).^[31,32] The 9-CoCRRs array described in this manuscript is selective enough to address, at least in part, this question by allowing clustering HSbps in two main groups.

Beyond the detection and identification of pure analytes, a long-term goal of the eN/eT technology is to analyze and quantify complex mixtures. We decided to challenge the capacity of the **BB1-BB2** CoCRRs array for the analysis of mixtures. We thus

prepared Mix1 (200 nM ECL + 100 nM CXCL12 α) and injected it over the array. Gratifyingly, a simple visual examination of the resulting CEP, easily distinguishable from the parent proteins one, established that the 9-CoCRRs array was sensitive to the mixture and able to discriminate between Mix1 and the individual proteins (Fig. 4A). In addition, the Mix1 CEP follows closely the simple addition of the ones of the pure proteins. An identical additive behavior was also observed with two other mixtures: Mix2 (100 nM CXCL12 α + 25 nM IFN γ) and Mix3 (200 nM ECL + 25 nM IFN γ), confirming the potency of the CoCRRs sensing/CEP analysis for the identification and quantification of mixtures components by a simple linear decomposition into the CEP of the pure analytes.

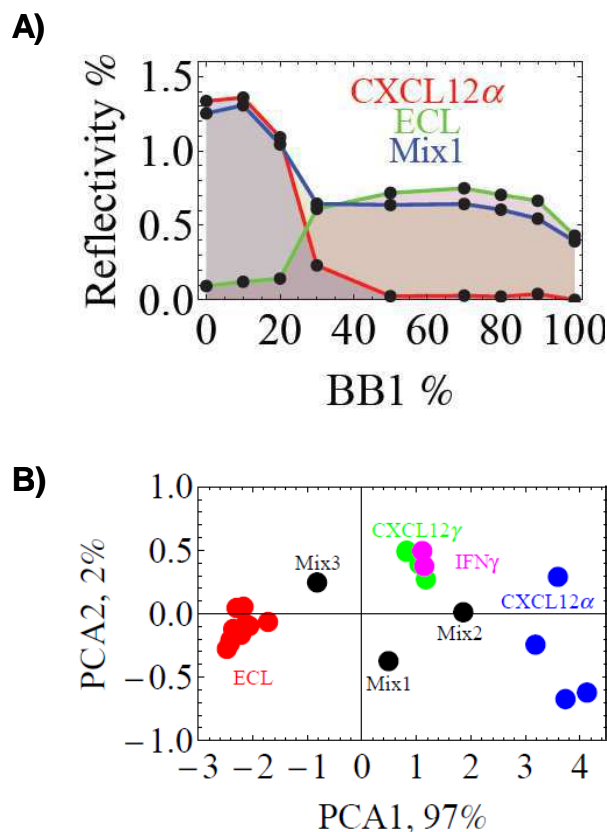


Figure 4. A) CEP of Mix1 (ECL + CXCL12 α) compared to the ones of pure ECL and CXCL12 α ; B) Two-dimensional PCA score plot showing clustering of the four proteins and the three mixtures for differentiation. The various dots for a given protein correspond to different concentrations.

Since visual examination of CEP is prone to partial interpretations, all CEP patterns were submitted to principal component analysis (PCA). This mathematical approach is extremely useful by allowing reducing the dimensionality of a data set to a size that can be accommodated graphically. Briefly, a high dimensional correlated data set is decomposed among various uncorrelated principal components ranked with respect to the variance of the data set along those components. In this work, PCA was performed using the appropriate package within Mathematica 6.0 software. In order to eliminate the concentration dependence, the profiles were normalized before the data were subjected to PCA. The resulting two-dimensional PCA score plot (Fig. 4B), established that the first two components represent already more than 99% of the variability of the data set. In this figure, the different dots for a

given protein correspond to experiments performed at various concentrations. Clustering of the analytes illustrates the ability of the **BB1-BB2** CoCRRs array to discriminate the pure as well as mixed protein samples. Indeed, ECL is clearly distinguishable from the other proteins, while CXCL12 α isoform is readily distinguished from the other HSbps. Not unexpectedly, the clustering patterns of CXCL12 γ and IFN γ are almost overlapped indicating that the PCA analysis did not allow their differentiation. The preliminary results concerning CEP patterns of the protein mixtures were also analyzed with PCA. Their corresponding dots lie in between the clusters of the pure proteins confirming that the interactions of the mixture with the array are dependent on both proteins in the mixtures.

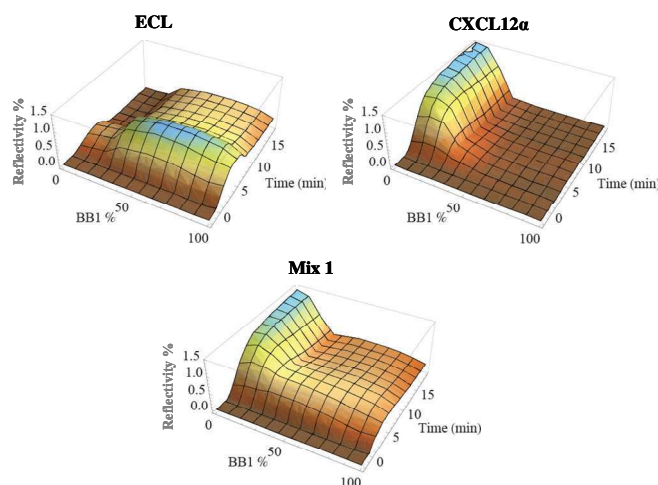


Figure 5. Continuous Evolution Landscapes (CEL): 3D model of the recognition patterns of ECL, CXCL12 α and their mixture ECL + CXCL12 α by introducing the time evolution.

As described above, the CEP pattern analysis, resulting from the recording of an interaction data set between a given analyte and the array of continuous composition evolutive CoCRRs, brings more reliable information than the signals of non correlated CRs obtained from previously described eN/eT. From an instrumental point of view, the acquisition of such correlated data sets is not restricted to SPR detection. However, one of the main advantages of SPR techniques is the possibility to monitor the real time adsorption and desorption kinetics. Such a continuous dimension in the analysis introduces a new discrimination parameter since two proteins presenting the same relative affinity for a set of CoCRRs may still differ in their kinetics of interaction. As an illustration, the time dependant recognition pattern for ECL and CXCL12 α are displayed in Fig. 5. The Continuous Evolution Landscape (CEL), where the two abscises correspond to the time evolution and the BB1 ratios in the mixtures, points out the additional value of real-time SPRi interaction measurements: the discrimination between the two proteins is easier relative to simple CEP. In addition, the third CEL, corresponding to the analysis of Mix 1, shows that CEL follows the additive behavior found for the CEP of mixtures. It is expected that such supplementary information should facilitate the future identification and quantification of analytes in a mixture. However, irrespective of the data analyses performed, CXCL12 γ and IFN γ remained non differentiable with this CoCRRs array. We are currently working on the design and construction of a new CoCRRs array by introducing additional building blocks with different physicochemical properties in order to provide greater diversity in

the CoCRRs array, with the aim to differentiate HSbps with similar but not identical surface charge topologies.

In summary, we have demonstrated that a collection of combinatorial surfaces, generated by self assembly of only two small and easily accessible molecules, were behaving as cross-reactive receptors allowing the identification of single as well as mixed proteins in solution, using SPRi measurements. We thus established this new approach as a promising procedure for the rapid implementation of electronic tongue. Besides the straightforward preparation of such devices, the identification and quantification of analytes is greatly simplified and secured with the Continuous Evolution Profiles or Landscapes. We thus strongly believe that this new approach will help designing cheaper and more reliable non-specific sensor arrays. The CoCRRs diversification, using more building blocks, joined with the time evolution analysis will open the field of multidimensional analysis of complex mixtures.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

Keywords: Electronic tongue • disaccharide • pattern recognition • heparan sulfate binding protein • surface plasmon resonance imaging

- [1] L. D. Bonifacio, G. A. Ozin, A. C. Arsenault, *Small* **2011**, 7, 3153.
- [2] A. K. Deisingh, D. C. Stone, M. Thompson, *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, 39, 587.
- [3] J. W. Gardner, T. C. Pearce, S. Friel, P. N. Bartlett, N. Blair, *Sens. Actuators, B* **1994**, 18, 240.
- [4] H. Lin, M. Jang, K. S. Suslick, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 16786.
- [5] L. Feng, C. J. Musto, J. W. Kemling, S. H. Lim, W. Zhong, K. S. Suslick, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 9433.
- [6] S. H. Lim, L. Feng, J. W. Kemling, C. J. Musto, K. S. Suslick, *Nat. Chem.* **2009**, 1, 562.
- [7] N. G. Hockstein, E. R. Thaler, Y. Q. Lin, D. D. Lee, C. W. Hanson, *Annals of Otology Rhinology and Laryngology* **2005**, 114, 504.
- [8] X. Chen, F. J. Xu, Y. Wang, Y. F. Pan, D. J. Lu, P. Wang, K. J. Ying, E. G. Chen, W. M. Zhang, *Cancer* **2007**, 110, 835.
- [9] J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 3119.
- [10] D. Margulies, A. D. Hamilton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 705.
- [11] A. T. Wright, E. V. Anslyn, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 14.
- [12] A. P. Umali, E. V. Anslyn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 685.
- [13] L. Baldini, A. J. Wilson, J. Hong, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5656.
- [14] H. C. Zhou, L. Baldini, J. Hong, A. J. Wilson, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2421.
- [15] A. T. Wright, M. J. Griffin, Z. L. Zhong, S. C. McCleskey, E. V. Anslyn, J. T. McDevitt, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 6375.
- [16] C. C. You, O. R. Miranda, B. Gider, P. S. Ghosh, I. B. Kim, B. Erdogan, S. A. Krovi, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 318.
- [17] R. L. Phillips, O. R. Miranda, C. C. You, V. M. Rotello, U. H. F. Bunz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 2590.
- [18] A. Bajaj, O. R. Miranda, I. B. Kim, R. L. Phillips, D. J. Jerry, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 10912.
- [19] M. De, S. Rana, H. Akpinar, O. R. Miranda, R. R. Arvizo, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *Nat. Chem.* **2009**, 1, 461.
- [20] E. Mercey, R. Sadir, E. Maillart, A. Roget, F. Baleux, H. Lortat-Jacob, T. Livache, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 3476.
- [21] J. Fuchs, J. B. Fiche, A. Buhot, R. Calemczuk, T. Livache, *Biophys. J.* **2010**, 99, 1886.
- [22] J. Kreuger, D. Spillmann, J. P. Li, U. Lindahl, *J. Cell Biol.* **2006**, 174, 323.
- [23] M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 3118.
- [24] A. Imbert, H. Lortat-Jacob, S. Perez, *Carbohydrate Res.* **2007**, 342, 430.

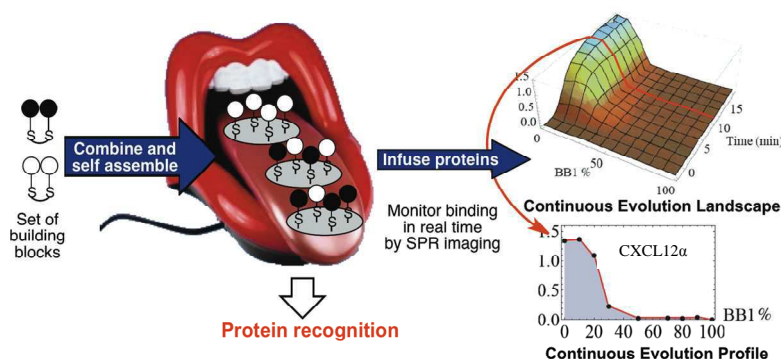
-
- [25] H. Lortat-Jacob, A. Grosdidier, A. Imberty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 1229.
- [26] M. P. Dubois, C. Gondran, O. Renaudet, P. Dumy, H. Driguez, S. Fort, S. Cosnier, *Chem. Commun.* **2005**, 4318.
- [27] C. Laguri, R. Sadi, P. Rueda, F. Baleux, P. Gans, F. Arenzana-Seisdedos, H. Lortat-Jacob, *PLoS One* **2007**, 2.
- [28] S. Sarrazin, D. Bonnaffe, A. Lubineau, H. Lortat-Jacob, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 37558.
- [29] K. Turton, R. Natesh, N. Thiagarajan, J. A. Chaddock, K. R. Acharya, *Glycobiology* **2004**, 14, 923.
- [30] H. Lortat-Jacob, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 543.
- [31] H. Lortat-Jacob, J. E. Turnbull, J. A. Grimaud, *Biochem. J.* **1995**, 310, 497.
- [32] D. Bonnaffe, *C. R. Chimie* **2011**, 14, 29.
-

Electronic tongue

Yanxia Hou,* Maria Genua, Dayane Tada Batista, Roberto Calemczuk, Arnaud Buhot, Pauline Fornarelli, Jamal Koubachi, David Bonnaffé,* Els Saesen, Cédric Laguri, Hugues Lortat-Jacob and Thierry Livache*

Page – Page

Continuous Evolution Profiles for Electronic Tongue Based Analysis



A new type of electronic tongue (eT) was constructed by self assembly, on the gold surface of a Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) prism, of combinations of easily accessible building blocks. The resulting Combinatorial Cross Reactive Receptors (CoCCR) array was infused with protein solutions using SPR imaging for monitoring the interactions. In contrast to discrete and uncorrelated data obtained with traditional eN/eT approaches, we found that the signal for each CoCCR was: 1) both dependant on its composition and on the protein infused; 2) correlated to the response of its neighbors. As a consequence, Continuous Evolution Profiles (or Landscapes) could be interpolated for each protein allowing their identification and quantification with unprecedented ease and reliability.

Supporting information

Continuous Evolution Profiles for Electronic Tongue Based Analysis **

Yanxia Hou, Maria Genua, Dayane Tada Batista, Roberto Calemczuk, Arnaud Buhot, Pauline Fornarelli, Jamal Koubachi, David Bonnaffé,* Els Saesen, Cédric Laguri, Hugues Lortat-Jacob and Thierry Livache**

Supporting information

Contents

1. Materials
2. Disaccharides **BB1** and **BB2** preparation
3. Surface plasmon resonance imaging
4. Calibration curve for the CoCRRs array

1. Materials

Erythrina cristagalli lectin (Mw 54 kDa) was purchased from Sigma-Aldrich and used as received. CXCL12 α (Mw 7.8 kDa) and CXCL12 γ (Mw 11.6 kDa) were prepared as follows. Murin CXCL12 (α and γ) cDNA were inserted in a pET17b (Novagen) expression vector. CXCL12 proteins were overexpressed overnight in *E. coli* BL21 (DE3) cells, with 0.4 mM IPTG, in LB medium. Cells were sonicated for 30 min at 4 °C in 50 mM Tris pH 8.0 (buffer A), after which the released inclusion bodies were pelleted (20000g for 15 min) and were solubilized for 15 min at 50 °C in 7.5 M GdCl₂ and 100 mM DTT. Refolding was performed by rapid dilution to 1 M GdCl₂. The mixture was gently stirred overnight at 4 °C after addition of Complete protease inhibitors (Roche), then diluted 4 times and loaded onto a 3 ml Source S column (Amersham) equilibrated in 20 mM Na₂HPO₄ pH 6.0. Bound proteins were eluted with a NaCl gradient, concentrated and further purified on a G75 gel filtration column (Amersham) in 20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl pH 6.0. Purified material was analyzed by MALDI mass spectrometry and quantified by amino acids analysis. IFN γ (monomer Mw 17 kDa) was prepared as follows. cDNA was cloned into pET11a expression Human IFN γ vector (Novagen), and used to transform *E. coli* strain BL21 Star DE3 (Invitrogen). Cells, grown at 37 °C in Luria broth medium containing 100 μ g/ml ampicillin were induced with 0.5 mM IPTG for 5 h. The resulting inclusion bodies (IB) were solubilized in 6 M Gdn/HCl, and the protein was refolded by dilution to 0.2 mg/ml into 50 mM phosphate buffer and 0.5 M Gdn/HCl pH 7. IFN γ was purified by ion exchange (Mono S HR 5/5 column) chromatography resolved with a 0.15 to 1 M NaCl gradient and gel filtration (Superdex 75 column equilibrated in 10 mM Tris, 10 mg/ml Mannitol pH 6.8). Purified material was characterized by mass spectrometry and N-terminal sequencing, and quantified by amino acid analysis. Biological activity of IFN γ was determined by the inhibition of the cytopathic effect of the vesicular stomatitis virus on a monolayer of Wish cells, while that of CXCL12 by cellular chemoattraction assay.

2. Disaccharides preparation

The two combinatorial components **BB1** and **BB2** were easily prepared from the known β -lactoside **1**^[1] that was first converted to the lactosylated disulfide **BB1** using HATU mediated amide bond formation between amine **1** and acid **2**. Further sulfatation in standard conditions leads to incomplete sulfation as evidenced by ¹H and ¹³C NMR. Gratifyingly, further treatment of this mixture with sulfurtrioxide•pyridine complex in DMF at 60 °C allowed to complete the sulfation leading to the fully sulfated disulfide **BB2**. In order to increase solubility in organic solvent compound **BB2** was conditioned as tetrabutylammonium salt.

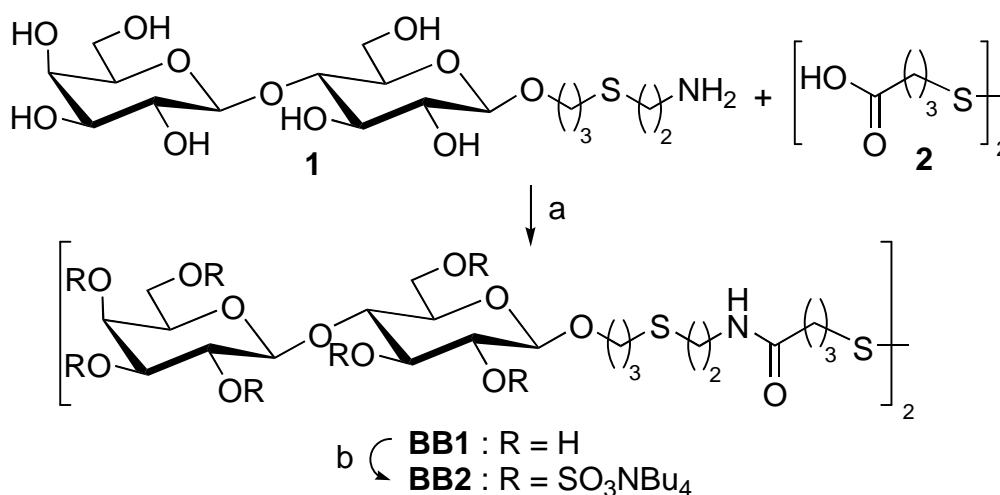


Figure S1. a. HATU, DIPEA, DMT, RT (74 %); b. Pyridine•SO₃, DMF, 55 °C, 48 h, then 60 °C 48h (92%).

a) 11,11'-Dithiobis [3-[propynylamido-2-(aminoethyl)-thio]-propyl β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (**BB1**)

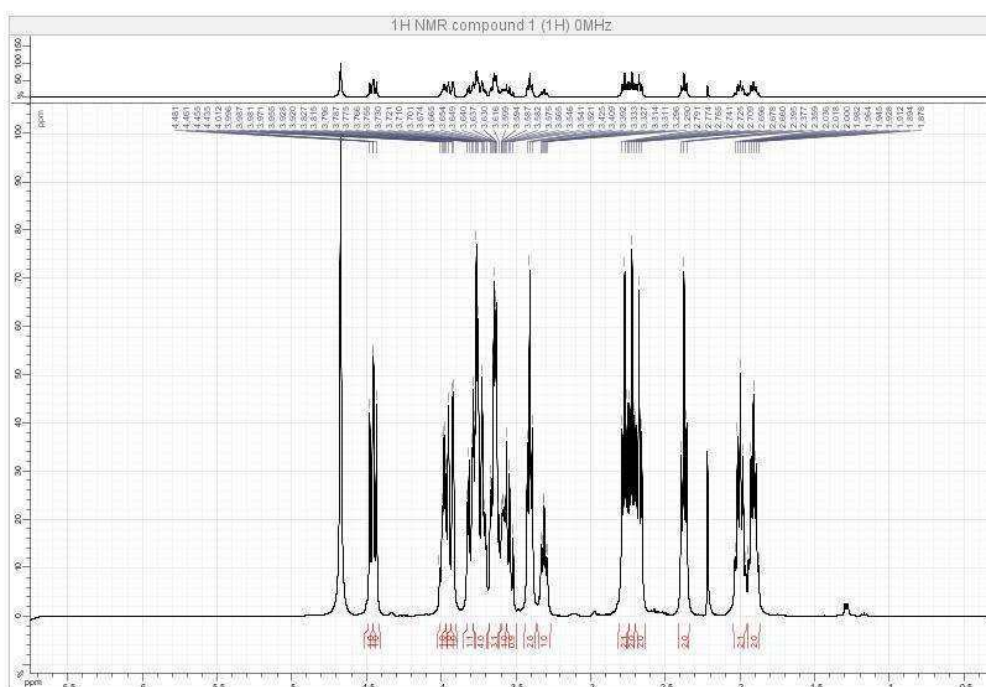
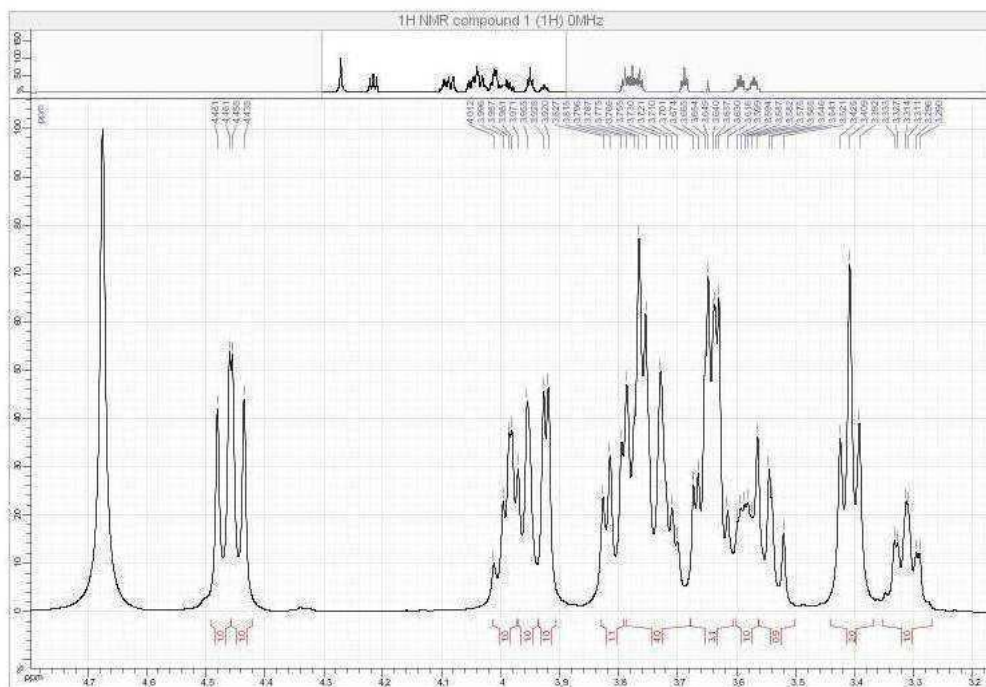
Acid **2** (41 mg; 0.17 mmol), HATU (175 mg; 0.46 mmol.) and DIPEA (177 μ L; 1.02 mmol) were successively added to a solution of β -lactoside **1**^[1] (194 mg; 0.42 mmol) in DMF (2 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After complete conversion, the reaction was quenched by the addition of H₂O (1 mL) and purified by C18 flash chromatography (H₂O/CH₃CN 100:0 to 70:30). After pooling the appropriate fractions, evaporation of acetonitrile and lyophilisation, the lactosylated disulfide **BB1** was obtained with 74% yield.

NMR spectra were recorded in D₂O at rt with Bruker Avance 400 spectrometer using standard pulse programs. Chemical shifts are given in part per millions (ppm) relative to acetone (¹H d = 2.225 ppm and ¹³C d = 30.5 ppm). The aglycon carbons are numbered a, b, c, d, e, f and g, starting from the one linked to the lactosyl moiety.

¹H NMR (400 MHz, D₂O, ref Acetone): δ = 4.47 (d, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.45 (d, $J_{1',2'}$ = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 3.99 (dd, $J_{a,a'}$ = 10.0 Hz, $J_{a,b}$ = 6.5 Hz, 1H, H-a), 3.97 (dd, $J_{6a,6b}$ = 12.5 Hz, $J_{6a,5}$ = 2.0 Hz, 1H, H-6a), 3.92 (d, $J_{4',3'}$ = 3.5 Hz, 1H, H-4'), 3.81 (dd, $J_{6b,6a'}$ = 12.5 Hz, $J_{6b,5}$ = 4.5 Hz, 1H, H-6b), 3.80-3.69 (m, 4H, H-a', H-5', H-6'a, H-6'b), 3.66 (dd, $J_{3',2'}$ = 10.0 Hz, $J_{3',4'}$ = 3.5 Hz, 1H, H-3'), 3.65-3.60 (m, 2 H, H-3 and

H-4), 3.58 (ddd, $J_{5,4} = 10.0$ Hz, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, $J_{5,6a} = 2.0$ Hz, 1H, H-5), 3.55 (dd, $J_{2',3} = 10.0$ Hz, $J_{2',1'} = 7.5$ Hz, 1H, H-2'), 3.41 (t, $J_{e,d} = 6.5$ Hz, 2H, H-e), 3.35-3.27 (m, 1H, H-2), 2.77 (t, $J_{f,e} = J_{f,g} = 6.5$ Hz, 2H, H-f), 2.0 (quint, $J_{g,h} = J_{g,f} = 6.5$ Hz, 2H, H-g), 1.91 (m, 2H, H-b); ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O , ref Acetone): $\delta = 175.37$ (CO), 102.62 (C-1'), 101.84 (C-1), 78.20 (C-4), 75.00 (C-5'), 74.42 (C-5), 74.42 (C-3'), 72.51 (C-2), 72.24 (C-3), 70.62 (C-2'), 68.53 (C-a), 68.21 (C-4'), 60.65 (C-6), 59.85 (C-6'), 38.23 (C-e), 36.90 (C-h), 34.02 (C-f), 30.27 (C-d), 28.62 (C-b), 27.19 (C-c), 24.46 (C-g).

ESI HR-MS m/z calculated for $\text{C}_{42}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{24}\text{NaS}_4^+$: 1143.35631, found: 1143.35631 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).



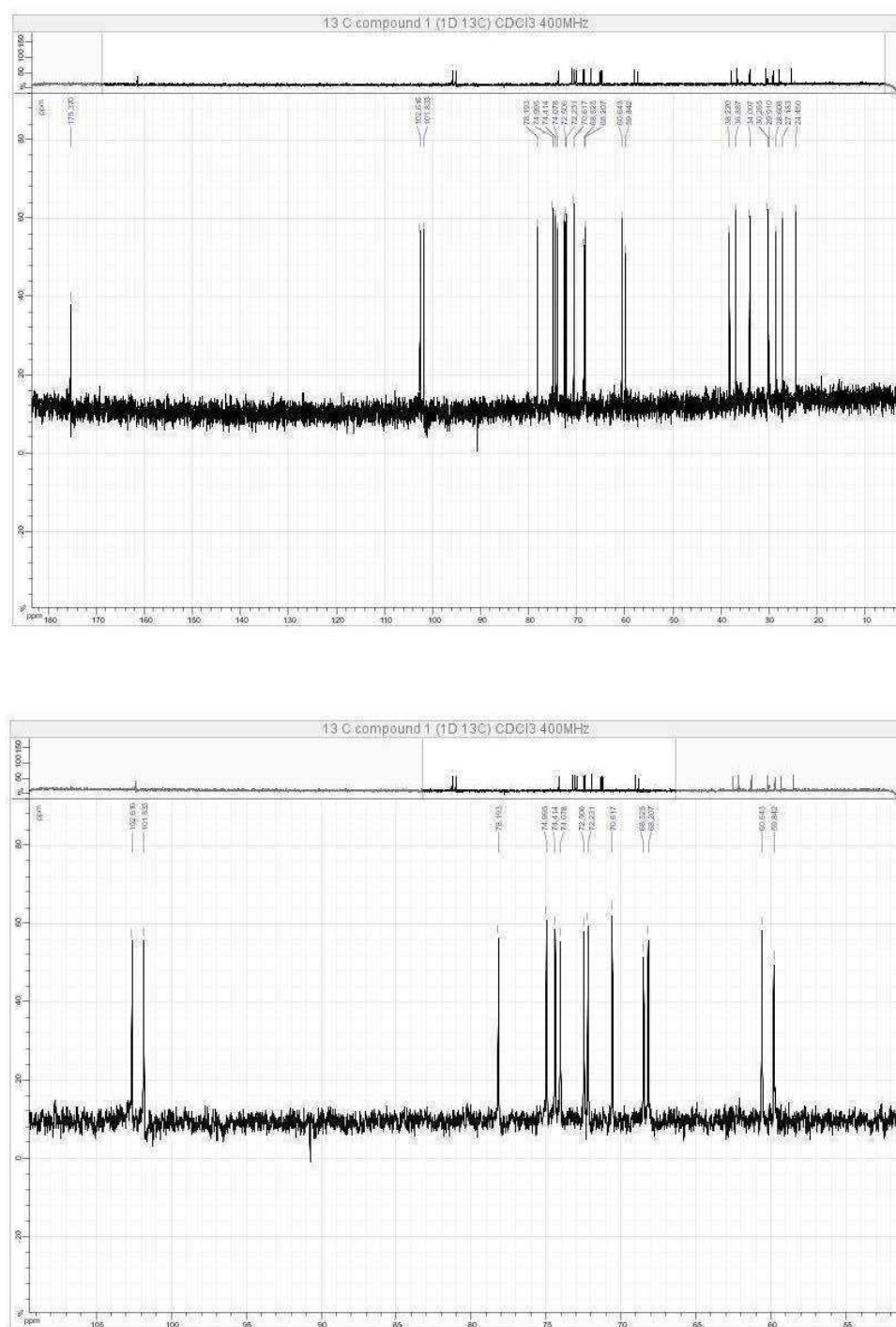


Figure S2. ^1H and ^{13}C spectra of lactosylated disulfide **BB1**.

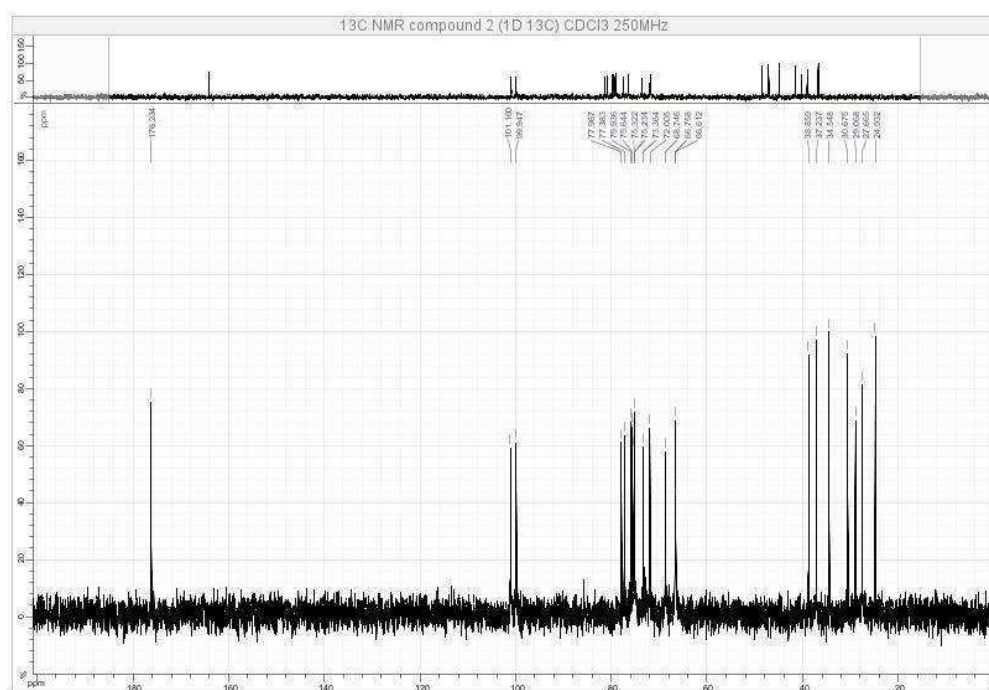
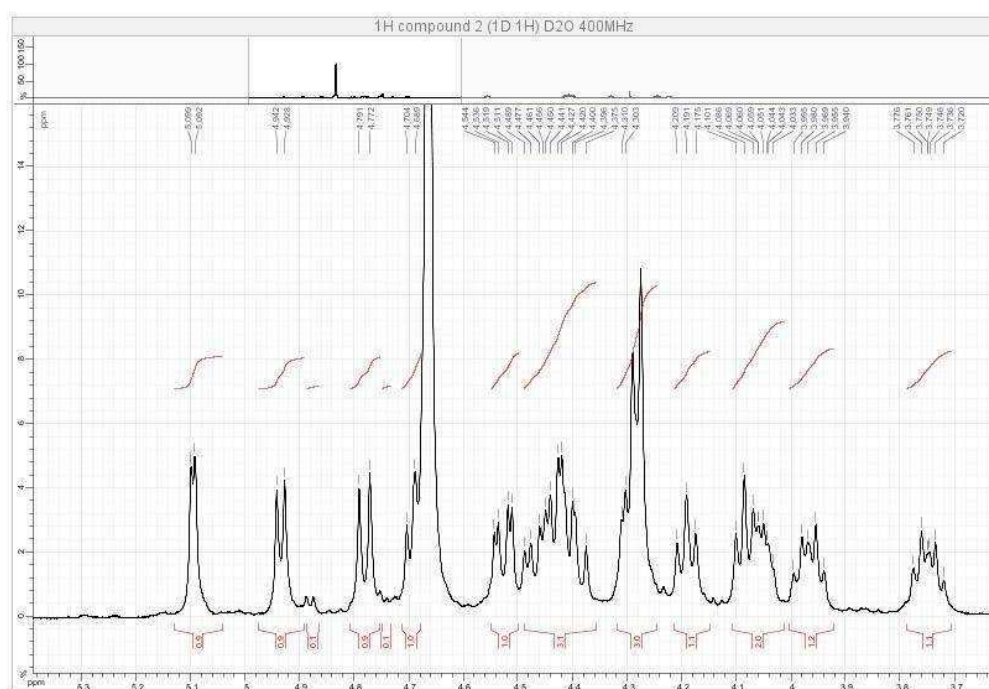
b) Sulfated 11,11'-Dithiobis [3-[propynylamido-2-(aminoethyl)-thio]-propyl β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (BB2**); $\text{R} = \text{SO}_3\text{Na}$**

In a screw-capped tube, sulfurtrioxide \cdot pyridine complex (2.33 g; 14.65 mmol, 5 equiv for each hydroxyl group) was added, under argon, to a solution of disulfide **BB1** (288.40 mg; 0.26 mmol) dissolved in dry pyridine (2.6 ml). The vial was closed and stirred for 48 h at 55 $^\circ\text{C}$. The mixture was then cooled to 0 $^\circ\text{C}$ and quenched by the addition of $\text{HCO}_3\text{-NEt}_3$ (2 M, pH=7, 2 mL) and H_2O (5 ml). After stirring at r.t for 1 h, the reaction mixture was directly applied onto a RP-18 column, which was eluted with 20% CH_3CN in $\text{HCO}_3\text{-NEt}_3$ (20 mM, pH = 7). The appropriate fractions were evaporated under reduced pressure and the residue was passed through a ion exchange column (BioRad AG 50W-X8 200, Na^+). The filtrate was concentrated and lyophilized. Crude ^1H and ^{13}C NMR indicated that the sulfation was incomplete. Gratifyingly, it was possible to drive the reaction to completion by treatment of this mixture with sulfurtrioxide \cdot pyridine complex in pyridine at 60 $^\circ\text{C}$ for 48 h. After cooling to 0 $^\circ\text{C}$, the reaction was quenched by addition of NEt_3 (1.5 equiv for each equiv of sulfur trioxide

¹H NMR (400 MHz, D₂O, ref Acetone): δ= 5.10 (d, $J_{4',3'}=3.0$ Hz, 1H, H-4'), 4.94 (d, $J_{1,2}=6.0$ Hz, 1H, H-1), 4.78 (d, $J_{1',2'}=7.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.69 (dd, $J_{3,4}=7.0$ Hz, $J_{3,2}=5.0$ Hz, 1H, H-3), 4.53 (dd, $J_{3',2'}=10.0$ Hz, $J_{3',4'}=3.0$ Hz, 1H, H-3'), 4.47 (dd, $J_{6a,6b}=10.5$ Hz, $J_{6a,5}=5.5$ Hz, 1H, H-6a), 4.44 (dd, $J_{2,1}=6.0$ Hz, $J_{2,3}=5.0$ Hz, 1H, H-2), 4.39 (dd, $J_{2',3'}=10.0$ Hz, $J_{2',1'}=7.5$ Hz, 1H, H-2'), 4.29 (dd, $J_{6b,6a}=10.5$ Hz, $J_{6b,5}=3.5$ Hz, 1H, H-6b), 4.28 (d, $J_{6',5'}=6.0$ Hz, 2H, H-6'a=H-6'b), 4.19 (t, $J_{4,5}=J_{4,3}=7.0$ Hz, 1H, H-4), 4.08 (t, $J_{5',6'}=6.0$ Hz, 1H, H-5'), 4.05 (dd, $J_{5,4}=7.0$ Hz, $J_{5,6a}=5.5$ Hz, $J_{5,6b}=3.5$ Hz, 1H, H-5), 3.97 (dt, $J_{a,a'}=10.0$ Hz, $J_{a,b}=6.0$ Hz, 1H, H-a), 3.95 (dt, $J_{a,a'}=10.0$ Hz, $J_{a,b}=6.0$ Hz, 1H, H-a'), 3.45 (t, $J_{e,d}=6.5$ Hz, 2H, H-e), 2.76 (t, $J_{h,g}=7.0$ Hz, 2H, H-h), 2.72 (t, $J_{d,e}=6.5$ Hz, 2H, H-d), 2.69 (t, $J_{c,b}=7.5$ Hz, 2H, H-c), 2.37 (t, $J_{f,g}=7.0$ Hz, 2H, H-f), 1.99 (quint, $J_{g,h}=J_{g,f}=7.0$ Hz, 2H, H-g), 1.93-1.86 (m, 2H, H-b);

ESI HR-MS m/z calculated for $C_{42}H_{62}N_2O_{66}S_{18}Na_{11}^{3+}$: 826.1806 found: 826.1760 ($[M-3Na]^{3+}/3$); $C_{42}H_{62}N_2O_{66}S_{18}Na_{10}^{4+}$: 613.8882 found: 613.8850 ($[M-4Na]^{4+}/4$) and $C_{42}H_{62}N_2O_{66}S_{18}Na_9^{5+}$: 486.5127 found: 486.5100 ($[M-5Na]^{5+}/5$).





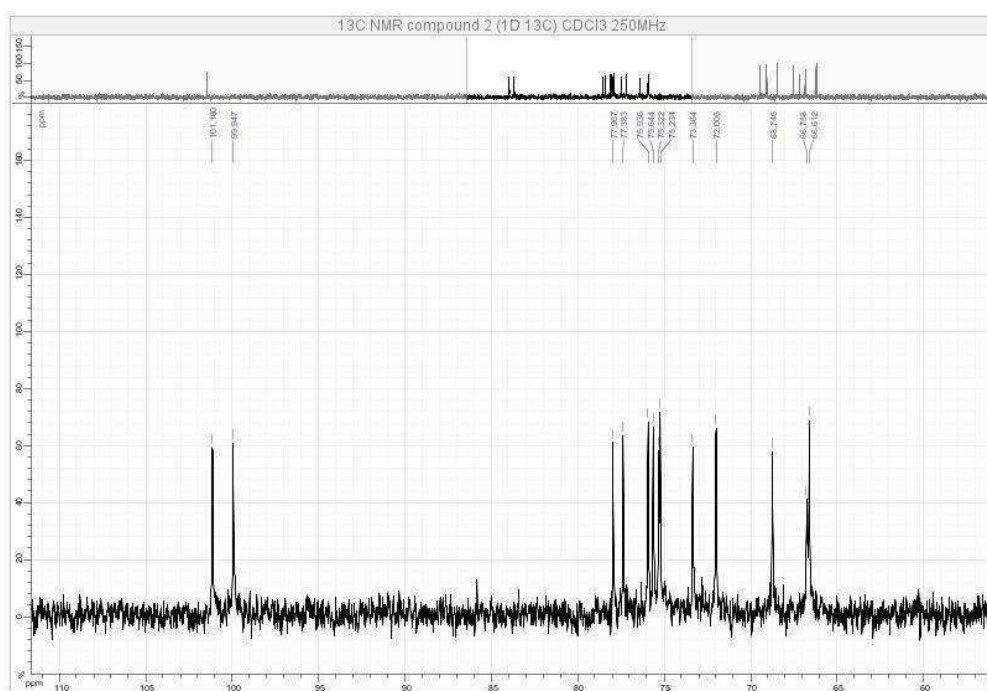


Figure S3. ^1H and ^{13}C spectra of sulfated disulfide BB2.

3. SPRI

SPRI detection is extremely sensitive to small changes in optical thickness at the interface between the thin gold layer and bulk solution. Binding of protein on CoCRRs produced changes in the refractive indexes, which were recorded by an 8-bit CCD camera-level contrasts at fixed intervals of time (0.2 s). All SPR images were collected and subsequently converted to percent reflectivity values using Imaging software (Genoptics), leading to a series of sensorgrams. The CoCRRs array was constructed by spotting pure or mixed lactose and sulfated lactose solutions at a total concentration of 20 μM in a phosphate buffer solution (50 mM NaH_2PO_4 , 50 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.8) on a gold prism. The drops were kept in contact with the prism surface overnight. Afterwards, the chip was cleaned with ethanol and dried under a flow of N_2 . Protein sensing was carried out in a 10 μl Teflon cell, which was connected to a degasser and a peristaltic pump. The volume of protein injected was 500 μl . Running buffer solution was HEPES (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween 20, 2 mM MgCl_2 , pH 7.4), which was filtered and degassed before use. All experiments were carried out at room temperature with a flow rate 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. In order to avoid non specific interactions with the bare gold surface, BSA was used to block the free gold surface prior to each protein injection. In this study, different concentrations were used for each analyte protein: ECL (200 nM, 400 nM, 800 nM and 1.6 μM), CXCL12 isoforms (100 and 200 nM), IFN γ (25 and 50 nM). After each protein sensing measurement, the chip was regenerated with solutions appropriate to each protein. In this paper, different solutions were tested and finally 0.02 M NaOH was chosen for regeneration after injection of ECL, 1 M NaCl (for CXCL12 α) and 1% SDS (for CXCL12 γ and IFN γ) were chosen because they permit complete regeneration of the chip without causing any damage. The CoCRRs array was very stable after at least twenty regenerations.

4. Calibration curve for the CoCRRs array

In order to verify if our array functions correctly, a calibrate curve was established. To do so, the data recorded at the end of complete protein injection ($T_{\text{injection}} + 8$ min) were used. The average reflectivity signals on CoCRRs for various ECL injection concentrations represent the calibration curve that fits a Langmuir adsorption profile, shown in Fig. S4. Moreover, a K_D of 300 \pm 150 nM for ECL could be extrapolated.

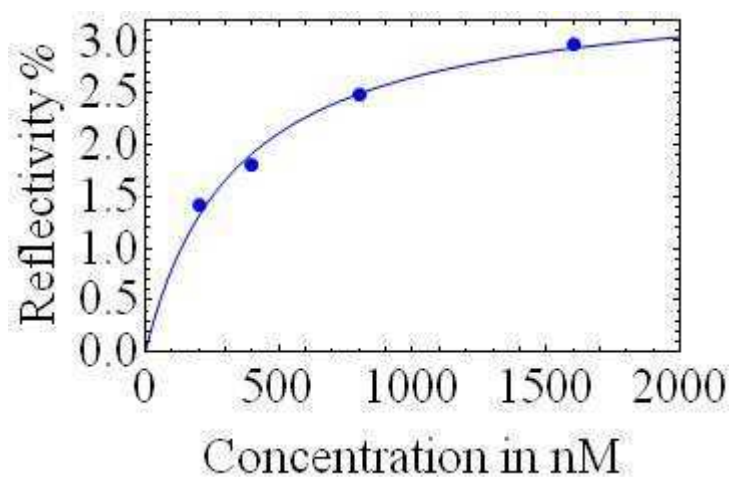


Figure S4. Calibration curve obtained with the CoCRRs array by averaging reflectivity signals on CoCRRs spots for ECL injections at different concentrations.

References:

- [1] M. P. Dubois, C. Gondran, O. Renaudet, P. Dumy, H. Driguez, S. Fort, S. Cosnier, *Chem. Commun.* **2005**, 4318.